



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais
MESTRADO

**Expressão diferencial de genes de plântulas de milho
inoculadas com *Azospirillum brasilense* FP2 e quantificação
de DNA bacteriano por qPCR.**

Eliandro Espindula

Orientadora: Prof^a Dr.^a Ana Carolina Maisonnave Arisi

Florianópolis, 2013

Eliandro Espindula

**Expressão diferencial de genes de plântulas de milho
inoculadas com *Azospirillum brasilense* FP2 e quantificação
de DNA bacteriano por qPCR.**

Dissertação submetida ao Programa
de pós Graduação em Recursos
Genéticos Vegetais da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências.

Orientadora: Prof^a Dr.^a Ana Carolina
Maisonnave Arisi

Florianópolis

2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca
Universitária da UFSC.

Espindula, Eliandro

Expressão diferencial de genes de plântulas de milho
inoculadas com *Azospirillum brasilense* FP2 e quantificação
de DNA bacteriano por qPCR / Eliandro Espindula ;
orientadora, Ana Carolina Maisonnave Arisi -

Florianópolis, SC, 2013.

137 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. *Azospirillum*
brasilense. 3. Interação Planta-Bactéria. I. Arisi, Ana
Carolina Maisonnave . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos
Genéticos Vegetais. III. Título.

Folha de Assinaturas

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que sempre guiou e iluminou meus passos ao me mostrar sempre quais os melhores caminhos a seguir, e a meus pais que com seu Amor sempre me apoiaram e acreditaram que eu poderia alcançar todos os meus sonhos.

Agradecimentos

A Deus, por me manter sempre no caminho certo

À Universidade Federal de Santa Catarina por me proporcionar a estrutura física e logística que me permitiram desenvolver este trabalho.

À minha orientadora, Ana Carolina Maisonnave Arisi, que acreditou no meu potencial enquanto cientista e me proporcionou a oportunidade de poder cursar a Pós – Graduação em Recursos Genéticos Vegetais e contar com sua orientação em meu trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais por me proporcionar a oportunidade de poder participar do curso de mestrado oferecido por este órgão e, assim, me conceder a chance de ter acesso a todo o conhecimento disponível neste por meio dos renomados professores que fazem parte deste programa.

À CAPES e ao INCT/FBN por proporcionarem os recursos necessários para a execução deste trabalho.

A meus pais, pelo Amor a mim dedicado e pela lição de vida de que somente com trabalho, dedicação e fé nós podemos alcançar nossos objetivos na vida.

Aos meus pais, Alberi Espindula e Leda Maria Espindula, meu irmão, Heitor Espindula, à tia Noelcia Espindula Bressan, ao tio Valter Bressan, à Tia Nera Espindula Cerva, ao tio Manoel (Maneco) Cerva, à tia Nelza (Dinda) Espindula Schieck, ao tio Norberto (Dindo) Schieck e aos primos frutos dessas uniões por todo Amor e por me ensinarem o que significa ser uma família.

À Égide Guareschi por seu apoio, companheirismo, Amor e carinho.

Aos amigos que sempre me apoiaram nos bons e maus momentos, me aconselhando e mostrando os caminhos em noites escuras e mal iluminadas.

Aos meus eternos mestres nas ciências e na vida – Umberto Euzebio (UnB), Silviene Oliveira (UnB), Zulmira M. Lacava (UnB), Loreny Giugliano (UnB), Rose Gomes Monnerat Sólton de Pontes (CENARGEN) – que com seu conhecimento e amizade me ensinaram o que é ser um cientista: Pessoa que consegue, ao se deparar com o desconhecido, analisar a situação a ele posta e, por meio da experimentação e dos conhecimentos disponíveis, alcançar a explicação para a situação.

À vida, que me ensinou que o melhor é sempre seguir em frente, sem deixar que as pedras e buracos da estrada atrapalhem nossa caminhada e que acima de tudo devemos aprender com nossos acertos e, principalmente, com nossos erros.

Aos meus amigos e colegas de trabalho Alexandro César Faleiro, Tomás Pellizzaro Pereira, Fábio Cristiano Angonesi Brod, Jéssica C. F. Bueno e Fernanda Plucani do Amaral e aos demais colegas do laboratório por toda a ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.”
(São Francisco de Assis)

Resumo

Azospirillum spp. são bactérias Gram-negativas de vida livre que foram isoladas na rizosfera de gramíneas e cereais tanto de climas tropicais como de climas temperados. Possuem como características principais a capacidade de fixar o nitrogênio gasoso e produzir fitormônios. Acredita-se que ambos os processos são responsáveis por favorecer o crescimento das plantas. Assim, com o intuito de avaliar como esta bactéria promotora de crescimento vegetal influencia o desenvolvimento do milho e como a planta reage à presença da mesma, foram comparados o número de raízes laterais, o comprimento de parte aérea e raízes e a massa fresca destas, e a expressão dos genes dos receptores de etileno, dos transportadores efluxo e influxo de auxina, dos genes envolvidos no *burst* oxidativo, na síntese de giberelinas e da via de sinalização MAPK em plântulas de milho (*Zea mays*) inoculadas e não inoculadas com a bactéria. Para isso, foram avaliadas duas variedades de milho (DKB240 e Pioneer 30F53) 1, 4, 7 e 10 dias após a inoculação (D.A.I.) com *A. brasilense* FP2. Além disso, o DNA bacteriano foi quantificado em plântulas inoculadas nestes tempos de coleta. Quanto às variáveis de crescimento, dentre as variedades de milho estudadas (DKB240 e Pioneer 30F53) somente foram detectadas diferenças estatísticas entre as plântulas inoculadas e não inoculadas quanto ao comprimento da parte aérea na variedade Pioneer 30F53 10 D.A.I.. Dessa forma, a partir das amostras de milho Pioneer 30F53, foi realizada a identificação e a quantificação de DNA de *Azospirillum brasilense* FP2 nas amostras de milho inoculado em todos os tempos de coleta. Foi identificada a presença de DNA de *A. brasilense* FP2 nas amostras de milho inoculado por PCR convencional e posterior quantificação do DNA bacteriano nas amostras inoculadas foi realizada por meio de PCR em tempo real. Os dados de quantificação indicaram um aumento na quantidade de bactérias até 7 D.A.I. e uma diminuição destas na amostra 10 D.A.I.. Também foram realizadas as análises de expressão gênica e foi possível detectar diferenças entre as amostras de plântulas inoculadas e não inoculadas para os transcritos avaliados (*Zmaux1*, *Zmrboh*, *Zmmpk5*, *Zmga20ox4*, *Zmko1*). A expressão observada para os genes envolvidos no *burst* oxidativo (*ZmrbohA* e *ZmrbohB*) e para o gene envolvido na cadeia transdutora de

sinal (*Zmmpk5*) indica que existe resposta da planta à presença da bactéria, uma vez que houve aumento dos níveis de transcrito de *Zmmpk5* assim como da quantidade de DNA bacteriano nas raízes das plântulas inoculadas até 7 D.A.I e ocorreu diminuição dos níveis deste transcrito e de DNA bacteriano aos 10 D.A.I. nas amostras de plântulas inoculadas, indicando que a planta responde à interação com a bactéria.

Palavras-chaves: *Azospirillum brasilense*, interação planta-bactéria, *Zmaux1*, *Zmrboh*, *Zmmpk5*, *Zmga20ox4*, *Zmko1*.

Abstract

Azospirillum spp. are Gram-negative bacteria of free-living that were isolated from the rhizosphere of grasses and cereals in both tropical and temperate climates. They have as main characteristic the ability to fix the nitrogen gas and produce phytohormones. It is believed that both processes are responsible for promoting plant growth. Thus, in order to evaluate how this plant growth-promoting bacterium influences the development of maize and how this plant reacts to the presence of the same, we compared the number of lateral roots, the length of roots and shoots and the fresh weight of them, and the expression of the ethylene gene receptor, of the genes of influx and efflux auxin transporters, of the genes involved in the oxidative burst, and in the synthesis of gibberellins, and in the MAPK signaling pathway in the maize plantlets (*Zea mays*) inoculated and non-inoculated with the bacteria. For this, were evaluated two maize varieties (Pioneer 30F53 and DKB240) with 1, 4, 7 and 10 days after inoculation (DAI) with *A. brasilense* FP2. In addition, bacterial DNA was quantified in inoculated plantlets at these times. As for the growth variables among the maize varieties studied (DKB240 and Pioneer 30F53), statistical differences were found between inoculated and non-inoculated plantlets on the shoot length for the variety Pioneer 30F53 10 DAI. From the samples of maize variety Pioneer 30F53, it was performed the identification and quantification of the DNA of *Azospirillum brasilense* FP2 from maize samples inoculated at all sampling times. We identified, by conventional PCR, the presence DNA of *A. brasilense* in corn samples inoculated with this bacterium and the quantification of DNA in the inoculated samples was performed by real time PCR. The data from the quantitation indicated an increase in amount of bacteria up to 7 DAI and a decrease at 10 DAI. Were also conducted analyzes of gene expression and it was possible to detect differences between the inoculated and non-inoculated plantlets for the transcripts analyzed (*Zmaux1*, *Zmrboh*, *Zmmpk5*, *Zmga20ox4*, *Zmko1*). The expression observed for the genes involved in the oxidative burst (*ZmrbohA* and *ZmrbohB*) and for the gene involved in the signal transduction chain (*Zmmpk5*) indicates that the plant responds to the presence of the

bacterium, since there was a increasing both of the levels of transcripts of the gene *Zmmpk5* as of the amount of bacterial DNA in the roots of the inoculated plantlets up to 7 DAI and, with 10 DAI, there was a decrease in the levels of this transcript and in the quantity of the bacterial DNA in the inoculated plantlets, indicating that the plant responds to the interaction with the bacterium.

Key Words: *Azospirillum brasilense*, interaction plant-bacteria, *Zmaux1*, *Zmrboh*, *Zmmpk5*, *Zmga20ox4*, *Zmko1*.

Lista de Figuras:

FIGURA 1. ESQUEMA DE COMO <i>AZOSPIRILLUM</i> INFLUENCIA O CRESCIMENTO VEGETAL (ADAPTADO DE (BASHAN E DE-BASHAN, 2010).	36
FIGURA 2. ROTA DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL - 3 - ACÉTICO (AIA) DEPENDENTE DE TRIPTOFANO. SETAS SÓLIDAS: OS GENES RESPONSÁVEIS POR ESSES PASSOS FORAM IDENTIFICADOS EM PLANTAS E MICRORGANISMOS. SETAS TRACEJADAS: PASSOS PROPOSTOS, MAS OS GENES RESPONSÁVEIS POR ESSES PASSOS NÃO FORAM DETERMINADOS DE FORMA DEFINITIVA. ABREVIÇÕES: IAOX: INDOL-3-ACETALDOXIMA; IPA: INDOL – 3 – PIRUVATO; IAM: INDOL – 3 – ACETAMIDA; IAN: INDOL – 3 – ACETONITRILA; TAM: TRIPTAMINA (ADAPTADO DE ZHAO(2010)).	42
FIGURA 3. LOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS PIN NA CÉLULA VEGETAL IDENTIFICADAS EM <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> . AIA: ÁCIDO INDOL – 3 – ACÉTICO. (ADAPTADO DE KŘEČEK (2009). MP: MEMBRANA PLASMÁTICA; CG: COMPLEXO DE GOLGI.....	43
FIGURA 4. MECANISMO DE AÇÃO DAS AUXINAS (ADAPTADA DE. BISHOPP (2006))......	44
FIGURA 5. SÍNTESE DO ETILENO NAS CÉLULAS VEGETAIS E A REGULAÇÃO DE SUA PRODUÇÃO. MTA = 5 – METILTIOADENISINA; SAM = S – ADO MET. (ADAPTADO DE (WANG <i>ET AL.</i> , 2002).	46
FIGURA 6. MECANISMO DE RESPOSTA DOS RECEPTORES DE ETILENO (ADAPTADO DE BISHOPP (2006))......	47
FIGURA 7. VIA DE SÍNTESE DE GIBERELINAS EM PLANTAS (ADAPTADO DE HEDDEN E PHILLIPS (2000))......	50
FIGURA 8. MODELO REPRESENTATIVO DA ORGANIZAÇÃO SUBCELULAR DOS MÓDULOS DAS PROTEÍNAS QUINASES ATIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK) E SEUS ALVOS (SAMAJOVA <i>ET AL.</i> , 2012)......	52
FIGURA 9. DESENHO EXPERIMENTAL DE INOCULAÇÃO DE PLÂNTULAS DE MILHO COM <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> FP2. FORAM COLETADAS 9 PLÂNTULAS POR GRUPO EXPERIMENTAL PARA CADA UM DOS TEMPOS DE COLETA. O EXPERIMENTO FOI REALIZADO EM TRIPPLICATA.....	56
FIGURA 10. FLUXOGRAMA DE PROCESSO DE INOCULAÇÃO DE PLÂNTULAS DE MILHO, ISOLAMENTO DO DNA E DO RNA E QUANTIFICAÇÃO DOS	

TRANSCRITOS POR QRT-PCR E DO DNA BACTERIANO POR QPCR.
.....58

FIGURA 11. EQUAÇÃO UTILIZADA NO CÁLCULO DA EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES ALVOS DE ACORDO COM PFAFFL (2001) COM MODIFICAÇÕES PROPOSTAS POR MCMAUGH E LYON (2003) UTILIZANDO A A-TUBULINA COMO GENE DE REFERÊNCIA. $E_{(ALVO)} =$ EFICIÊNCIA DO GENE ALVO, $E_{(REF.)} =$ EFICIÊNCIA DO GENE DE REFERÊNCIA.69

FIGURA 12. PLÂNTULAS DE MILHO DKB240 NÃO INOCULADAS (A) E INOCULADAS COM *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* FP2 (B) DA 1ª REPETIÇÃO COLETADAS 1, 4, 7 E 10 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO (D.A.I.). OS ESPAÇOS NA ESCALA CORRESPONDEM A 1 CM.71

FIGURA 13. CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE MILHO (VARIEDADE DKB 240) EM SUBSTRATO ESTÉRIL APÓS INOCULAÇÃO COM A BACTÉRIA *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* FP2. FORAM REALIZADAS COLETAS COM 1, 4 7 E 10 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO (D.A.I.). (A) PESO DA PARTE AÉREA, (B) COMPRIMENTO DA PARTE AÉREA, (C) COMPRIMENTO DE RAIZ, E (D) PESO DA RAIZ. VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EP (N=27). ANOVA (P<0,05).72

FIGURA 14. NÚMERO DE RAÍZES LATERAIS DE PLÂNTULAS DE MILHO (VARIEDADE DKB240) CRESCIDAS EM AREIA ESTÉRIL APÓS INOCULAÇÃO COM A BACTÉRIA *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* FP2. FORAM REALIZADAS COLETAS COM 1, 4 7 E 10 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO (D.A.I.). VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EP (N=27). ANOVA (P<0,05).73

FIGURA 15. PLÂNTULAS DE MILHO PIONEER 30F53 NÃO INOCULADAS (A) E INOCULADAS COM *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* FP2 (B) DA 3ª REPETIÇÃO COLETADAS COM 1, 4, 7 E 10 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO (D.A.I.). OS ESPAÇOS NA ESCALA CORRESPONDEM A 1 CM.75

FIGURA 16. CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE MILHO (PIONEER VARIEDADE 30F53) EM SUBSTRATO ESTÉRIL APÓS INOCULAÇÃO COM A BACTÉRIA *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* FP2. FORAM REALIZADAS COLETAS COM 1, 4 7 E 10 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO (D.A.I.). (A) PESO DA PARTE AÉREA, (B) COMPRIMENTO DA PARTE AÉREA, (C) COMPRIMENTO DE RAIZ, E (D) PESO DA RAIZ. VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EP (N=27). ASTERISCO (*) INDICA DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ENTRE

AS MÉDIAS DOS GRUPOS DE PLÂNTULAS DE ACORDO COM O TESTE T ($P < 0,05$).	76
FIGURA 17. NÚMERO DE RAÍZES LATERAIS DE PLÂNTULAS DE MILHO (PIONEER VARIEDADE 30F53) CRESCIDAS EM SUBSTRATO ESTÉRIL APÓS INOCULAÇÃO COM A BACTÉRIA <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> FP2. FORAM REALIZADAS COLETAS COM 1, 4 7 E 10 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO (D.A.I.). VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA \pm EP (N=27). ANOVA ($P < 0,05$).	77
FIGURA 18. DETECÇÃO DOS FRAGMENTOS COM, RESPECTIVAMENTE, 439 PB E 455 PB DE AZNIFA-A (F)/ AZNIFA-A (R) E AZNIFA-B (F)/ AZNIFA-B (R). EM DUAS AMOSTRAS DE <i>A. BRASILENSE</i> E EM 2 AMOSTRAS DE <i>HERBASPIRILLUM SEROPEDICEA</i> . LEGENDA: CANALETAS 1 E 9: <i>AZOSPIRILLUM</i> AMOSTRA 1, CANALETAS 2 E 10: <i>AZOSPIRILLUM</i> AMOSTRA 2, CANALETAS 3 E 11: <i>AZOSPIRILLUM</i> AMOSTRA 2 DILUIDA (1:10), CANALETAS 4 E 12: <i>HERBASPIRILLUM</i> AMOSTRA 1, CANALETAS 5 E 13: <i>HERBASPIRILLUM</i> AMOSTRA 2, CANALETAS 6 E 14: <i>HERBASPIRILLUM</i> AMOSTRA 2 DILUÍDO (1:10), CANALETAS 7 E 15: ÁGUA, CANALETA 8: MARCADOR MOLECULAR (50 PB). AS AMOSTRAS DE 1 A 7 FORAM AMPLIFICADAS COM OS INICIADORES AZNIFA-A (F)/ AZNIFA-A (R) E AS AMOSTRAS 9 A 15 COM OS INICIADORES AZNIFA-B (F)/ AZNIFA-B (R).	79
FIGURA 19. DETECÇÃO DOS FRAGMENTOS COM, RESPECTIVAMENTE, 439 PB E 455 PB DE AZNIFA- (F)/ AZNIFA-A (R) E AZNIFA-B (F)/ AZNIFA- B (R). LEGENDA: CANALETA 1 : MARCADOR MOLECULAR (50 PB), CANALETAS 2 E 9: PLÂNTULAS NÃO INOCULADAS 10 D.A.I. (DKB240), CANALETAS 3 E 10 : PLÂNTULAS NÃO INOCULADAS 10 D.A.I. (PIONEER 30F53), CANALETAS 4 E 11: PLÂNTULAS INOCULADAS 10 D.A.I. (DKB240), CANALETAS 5 E 12 : PLÂNTULAS INOCULADAS 10 D.A.I. (PIONEER 30F53), CANALETAS 6 E 13: MILHO, CANALETAS 7 E 14 : <i>AZOSPIRILLUM</i> , CANALETAS 8 E 15: ÁGUA. CANALETAS DE 1 A 7: AMOSTRAS AMPLIFICADAS COM INICIADORES AZNIFA-A (F)/ AZNIFA-A (R), E AS CANALETAS 9 A 15: AMOSTRAS AMPLIFICADAS COM INICIADORES AZNIFA-B (F)/ AZNIFA- B (R).	81
FIGURA 20. DETECÇÃO DO FRAGMENTO COM 439 PB APÓS PCR USANDO OS INICIADORES AZNIFA-A (F) / AZNIFA-A (R). LEGENDA PARTE SUPERIOR : 1 : MARCADOR MOLECULAR (100 PB), 2,4,6,8, 10 E 12 :	

PLÂNTULAS NÃO INOCULADAS 7 D.A.I. (PIONEER 30F53), 3,5,7,9,11
 E 13 : PLÂNTULAS INOCULADAS 7 D.A.I. (PIONEER 30F53), 14 :
 PLÂNTULAS NÃO INOCULADAS 10 D.A.I. (PIONEER 30F53), 15 :
 PLÂNTULAS INOCULADAS 10 D.A.I. (PIONEER 30F53), 16 E 17:
 ÁGUA, 18 : AZOSPIRILLUM, 19: MILHO. LEGENDA PARTE INFERIOR : 1
 : MARCADOR MOLECULAR (100 PB), 2,4,6,8, 10 : PLÂNTULAS NÃO
 INOCULADAS 10 D.A.I. (PIONEER 30F53), 3,5,7,9,11 : PLÂNTULAS
 INOCULADAS 10 D.A.I. (PIONEER 30F53), 12 E 13: ÁGUA, 14 :
 AZOSPIRILLUM, 15: MILHO.82

FIGURA 21. DETECÇÃO DO FRAGMENTO COM 329 PB DO GENE QUE
 CODIFICA A PROTEÍNA ZEINA DE MILHO, APÓS PCR USANDO OS
 INICIADORES ZEO1 (F) / ZEO2 (R). LEGENDA PARTE SUPERIOR : 1 :
 MARCADOR MOLECULAR (100 PB), 2,4,6,8, 10 E 12 : PLÂNTULAS
 NÃO INOCULADAS 7 D.A.I. (PIONEER 30F53), 3,5,7,9,11 E 13 :
 PLÂNTULAS INOCULADAS 7 D.A.I. (PIONEER 30F53), 14 : PLÂNTULAS
 NÃO INOCULADAS 10 D.A.I. (PIONEER 30F53), 15 : PLÂNTULAS
 INOCULADAS 10 D.A.I. (PIONEER 30F53), 16 E 17: ÁGUA, 18 :
 MILHO, 19: AZOSPIRILLUM. LEGENDA PARTE INFERIOR : 1 :
 MARCADOR MOLECULAR (100 PB), 2,4,6,8, 10 : PLÂNTULAS NÃO
 INOCULADAS 10 D.A.I. (PIONEER 30F53), 3,5,7,9,11 : PLÂNTULAS
 INOCULADAS 10 D.A.I. (PIONEER 30F53), 12 E 13: ÁGUA, 14 :
 MILHO, 15: AZOSPIRILLUM.83

FIGURA 22. (A) DETECÇÃO DO FRAGMENTO COM 439 PB DO GENE NIFA DE
A. BRASILENSE EM RAIZ DE MILHO PIONEER 30F53 APÓS PCR
 USANDO INICIADORES AZNIFA-A (F) / AZNIFA-A (R). (B) DETECÇÃO
 DO FRAGMENTO DE 329 PB DO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA
 ZEINA EM RAIZ DE MILHO PIONEER 30F53 APÓS PCR USANDO
 INICIADORES ZEO1(F) E ZEO2(R) . LEGENDA PARTE SUPERIOR : 1
 : MARCADOR MOLECULAR (50 PB), 2,4 E 6 : PLÂNTULAS NÃO
 INOCULADAS 1 D.A.I (1ª ,2ª E 3ª REPETIÇÕES, RESPECTIVAMENTE);
 3,5 E 7: PLÂNTULAS INOCULADAS 1 D.A.I (1ª ,2ª E 3ª REPETIÇÕES,
 RESPECTIVAMENTE); 8,10 E 12 : PLÂNTULAS NÃO INOCULADAS 4
 D.A.I (1ª ,2ª E 3ª REPETIÇÕES, RESPECTIVAMENTE); 9,11 E 13:
 PLÂNTULAS INOCULADAS 4 D.A.I (1ª ,2ª E 3ª REPETIÇÕES,
 RESPECTIVAMENTE); 14,16 E 18: PLÂNTULAS NÃO INOCULADAS 7
 D.A.I (1ª,2ª E 3ª REPETIÇÕES, RESPECTIVAMENTE), 15,17 E 19 :
 PLÂNTULAS INOCULADAS 7 D.A.I (1ª ,2ª E 3ª REPETIÇÕES,

RESPECTIVAMENTE);. LEGENDA PARTE INFERIOR : 1 : MARCADOR MOLECULAR (50 PB), 2,4 E 6 : PLÂNTULAS NÃO INOCULADAS 10 D.A.I. (1ª ,2ª E 3ª REPETIÇÕES, RESPECTIVAMENTE); 3,5 E 7 : PLÂNTULAS INOCULADAS 10 D.A.I. (1ª,2ª E 3ª REPETIÇÕES, RESPECTIVAMENTE); 8,9,10 E 11: ÁGUA, 12 E 13 : <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> , 14 E 15: MILHO.	85
FIGURA 23. (A) DETECÇÃO DO FRAGMENTO COM 439 PB DO GENE NIFA DE <i>A. BRASILENSE</i> EM FOLHA DE MILHO PIONEER 30F53 APÓS PCR USANDO INICIADORES AZNIFA-A (F) / AZNIFA-A (R) –. (B) DETECÇÃO DO FRAGMENTO DE 329 PB DO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA ZEINA – ZEO1(F) E ZEO2(R) – EM FOLHA DE MILHO PIONEER 30F53. LEGENDA PARTE SUPERIOR : 1 : MARCADOR MOLECULAR (50 PB), 2,4 E 6 : PLÂNTULAS NÃO INOCULADAS 4 D.A.I (1ª ,2ª E 3ª REPETIÇÕES, RESPECTIVAMENTE); 3,5 E 7: PLÂNTULAS INOCULADAS 4 D.A.I (1ª ,2ª E 3ª REPETIÇÕES, RESPECTIVAMENTE); 8,10 E 12 : PLÂNTULAS NÃO INOCULADAS 7 D.A.I (1ª ,2ª E 3ª REPETIÇÕES, RESPECTIVAMENTE), 9,11 E 13: PLÂNTULAS INOCULADAS 7 D.A.I (1ª ,2ª E 3ª REPETIÇÕES, RESPECTIVAMENTE);. 14,16 E 18: PLÂNTULAS NÃO INOCULADAS 10 D.A.I. (1ª ,2ª E 3ª REPETIÇÕES, RESPECTIVAMENTE); 15,17 E 19 : PLÂNTULAS INOCULADAS 10 D.A.I. (1ª ,2ª E 3ª REPETIÇÕES, RESPECTIVAMENTE); LEGENDA PARTE INFERIOR : 1 : MARCADOR MOLECULAR (50 PB), 2,3 : ÁGUA;4 : <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> , 5: MILHO.	86
FIGURA 24. CURVAS DE EFICIÊNCIA DE qPCR USANDO COMO DNA MOLDE 3 EXTRAÇÕES INDEPENDENTES DE DNA DE <i>A. BRASILENSE</i>	89
FIGURA 25. NÚMERO DE CÓPIAS DE DNA DE <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> FP2 POR REAÇÃO (50 NG DE DNA TOTAL). VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± EP (N=3).	90
FIGURA 26. CURVAS DE EFICIÊNCIA DE qPCR USANDO COMO DNA MOLDE DNA DE <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> FP2 EM DILUIÇÃO SERIADA. CURVAS FORAM UTILIZADAS PARA QUANTIFICAR DNA BACTERIANO PRESENTE EM AMOSTRAS DE RAIZ INOCULADA.	91
FIGURA 27. EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES <i>ZMRBOHA</i> , <i>ZMRBOHB</i> E <i>ZMMPK5</i> EM RAÍZES DE PLÂNTULAS DE MILHO PIONEER 30F53 CRESCIDAS EM SUBSTRATO ESTÉRIL E INOCULADAS COM <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> FP2. AMOSTRAS PLÂNTULAS	

INOCULADAS E NÃO INOCULADAS FORAM COLETADAS 1, 4, 7 E 10 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO (D.A.I.). QUANTIDADE RELATIVA DE TRANSCRITOS FOI CALCULADA POR QRT – PCR USANDO O MÉTODO DE PFAFFL (2001) MODIFICADO POR MCMAUGH E LYON (2003), E A A – TUBULINA COMO GENE DE REFERÊNCIA. DADOS APRESENTADOS COMO MÉDIA ± EP (N = 9). ASTERISCO (*) INDICA DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS DE ACORDO COM WILCOX/MANN-WHITNEY (P<0,05).

.....99

FIGURA 28. EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *ZMPIN1A* EM PARTE AÉREA E DE *ZMAUX1* EM PARTE AÉREA (A) E EM RAÍZES (B) DE PLÂNTULAS DE MILHO PIONEER 30F53 CRESCIDAS EM SUBSTRATO ESTÉRIL E INOCULADAS COM *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* FP2. AMOSTRAS DE PLÂNTULAS INOCULADAS E NÃO INOCULADAS FORAM COLETADAS 1, 4, 7 E 10 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO (D.A.I.). QUANTIDADE RELATIVA DE TRANSCRITOS FOI CALCULADA POR QRT – PCR USANDO O MÉTODO DE PFAFFL (2001) MODIFICADO POR MCMAUGH E LYON (2003), E A A – TUBULINA COMO GENE DE REFERÊNCIA. DADOS APRESENTADOS COMO MÉDIA ± EP (N = 9). LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS DE ACORDO COM WILCOX/MANN-WHITNEY (P<0,05).100

FIGURA 29. EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES *ZMKO1* E *ZMGA20OX4* EM PARTE AÉREA (A) E EM RAÍZES (B) DE PLÂNTULAS DE MILHO PIONEER 30F53 CRESCIDAS EM SUBSTRATO ESTÉRIL E INOCULADAS COM *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* FP2. AMOSTRAS DE PLÂNTULAS INOCULADAS E NÃO INOCULADAS FORAM COLETADAS 1, 4, 7 E 10 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO (D.A.I.). QUANTIDADE RELATIVA DE TRANSCRITOS FOI CALCULADA POR QRT – PCR USANDO O MÉTODO DE PFAFFL (2001) MODIFICADO POR MCMAUGH E LYON (2003), E A A – TUBULINA COMO GENE DE REFERÊNCIA. DADOS APRESENTADOS COMO MÉDIA ± EP (N = 9). LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS DE ACORDO COM WILCOX/MANN-WHITNEY (P<0,05).101

FIGURA 30. EXPRESSÃO RELATIVA *ZMACT* EM PARTE AÉREA (A) E EM RAÍZES (B) DE PLÂNTULAS DE MILHO PIONEER 30F53 CRESCIDAS EM SUBSTRATO ESTÉRIL E INOCULADAS COM *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* FP2. AMOSTRAS DE PLÂNTULAS INOCULADAS E NÃO INOCULADAS FORAM COLETADAS 1, 4, 7 E 10 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO (D.A.I.).

QUANTIDADE RELATIVA DE TRANSCRITOS FOI CALCULADA POR QRT – PCR USANDO O MÉTODO DE PFAFFL (2001) MODIFICADO POR MCMAUGH E LYON (2003), E A A – TUBULINA COMO GENE DE REFERÊNCIA. DADOS APRESENTADOS COMO MÉDIA ± EP (N = 9). LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS DE ACORDO COM WILCOX/MANN-WHITNEY (P<0,05).....	102
FIGURA 31. ESQUEMA SOBRE A TRANSCRIÇÃO DOS GENES <i>ZMMPK5</i> , <i>ZMTBOHA</i> E <i>ZMRBOHB</i> EM RAÍZES DE PLÂNTULAS DE MILHO INOCULADAS COM <i>A. BRASILENSE</i> FP2 (ZHANG <i>ET AL.</i> , 2010; MARINO <i>ET AL.</i> , 2011; MARINO <i>ET AL.</i> , 2012).	108
FIGURA 32. ESQUEMA SOBRE A TRANSCRIÇÃO DOS GENES <i>ZMPIN1</i> E <i>ZMAUX1</i> EM PLÂNTULAS DE MILHO INOCULADAS COM <i>A. BRASILENSE</i> FP2 (ONA <i>ET AL.</i> , 2005; PERET <i>ET AL.</i> , 2012).....	109
FIGURA 33. ESQUEMA SOBRE A TRANSCRIÇÃO DOS GENES <i>ZMKO1</i> E <i>ZMGA2Oox4</i> EM PLÂNTULAS DE MILHO INOCULADAS COM <i>A. BRASILENSE</i> FP2 (METZGER E ZEEVAART, 1980; HEDDEN E PHILLIPS, 2000; CASSÁN <i>ET AL.</i> , 2001; BOTTINI <i>ET AL.</i> , 2004; SONG <i>ET AL.</i> , 2011)	112

Lista de Tabelas

TABELA 1. INICIADORES UTILIZADOS PARA DETECÇÃO DO GENE <i>AZNIFA</i> DA BACTÉRIA <i>A. BRASILENSE</i>	61
TABELA 2. INICIADORES USADOS PARA QRT-PCR NA ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA	65
TABELA 3. RESUMO DO EXPERIMENTO DE DETECÇÃO DE <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> FP2 EM AMOSTRAS DE PLÂNTULAS INOCULADAS E NÃO INOCULADAS POR MEIO DA AMPLIFICAÇÃO DE UM FRAGMENTO DA SEQUÊNCIA DO GENE DA BACTÉRIA <i>AZNIFA</i> . (+) DETECÇÃO DE PRODUTO DA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE <i>AZNIFA</i> (DETECÇÃO POSITIVA DE <i>A. BRASILENSE</i> FP2), (-) NÃO DETECÇÃO DE PRODUTO DA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE <i>AZNIFA</i> (NÃO DETECÇÃO DE <i>A. BRASILENSE</i> FP2).	87
TABELA 4. CONCENTRAÇÃO DOS INICIADORES UTILIZADOS.	95
TABELA 5. VALORES DAS EFICIÊNCIAS E DE R^2 DA AMPLIFICAÇÃO POR QRT-PCR PARA AS AMOSTRAS DE PARTE AÉREA DA PLANTA.	97
TABELA 6. VALORES DAS EFICIÊNCIAS E DE R^2 DOS INICIADORES UTILIZADOS PARA AS AMOSTRAS DE RAIZ.	98

Lista de Abreviaturas:

AIA = Ácido Indol-3-Acético

BPCV = Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal

cDNA = DNA complementar

D.A.I. = dias após a inoculação

DO₆₀₀ = Densidade ótica a 600 nm

DNA = Ácido Desoxiribonucleico

EP = Erro Padrão

mRNA = RNA mensageiro

Meio NFb/lactato = meio de cultura sem nitrogênio com lactato como fonte de carbono

Meio NFbHP/lactato = NFb/lactato com adição da solução de fosfato e de nitrogênio.

NMP = Número Mais Provável (MPN = Most Probable Number, inglês)

pb = pares de base

PCR = Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

qRT-PCR = Real-Time quantitative Retro Transcriptase PCR

qPCR = PCR quantitativa

RNA = Ácido Ribonucleico

Trp = Triptofano

UFC = Unidades Formadoras de Colônias

Sumário

1.	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA:	31
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:	33
2.1.	<i>O Milho (Zea mays): Produção e demanda por adubação nitrogenada</i>	33
2.2.	<i>Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (BPCV):</i>	35
2.3.	<i>Fitormônios:</i>	39
2.4.	<i>Via de Sinalização MAP quinase (MAPK):</i>	51
2.5.	<i>NADPH oxidase:</i>	53
3.	OBJETIVO GERAL.....	54
3.1.	<i>Objetivos Específicos</i>	54
4.	MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1.	<i>Cepa Bacteriana e Sementes</i>	55
4.2.	<i>Crescimento Bacteriano</i>	55
4.3.	<i>Inoculação de Milho por Azospirillum brasilense FP2</i> ..	55
4.4.	<i>Extração do DNA de A. brasilense FP2:</i>	59
4.5.	<i>Extração do DNA total de Milho:</i>	59
4.6.	<i>Iniciadores utilizados para detectar Azospirillum brasilense em amostras de milho:</i>	60
4.7.	<i>Condições da PCR convencional:</i>	62
4.8.	<i>Condições da PCR quantitativa (qPCR) :</i>	62
4.9.	<i>Extração do RNA total e síntese do cDNA:</i>	63
4.10.	<i>Iniciadores utilizados em qRT – PCR:</i>	64
4.11.	<i>Condições da qRT – PCR :</i>	69
4.12.	<i>Análise Estatística:</i>	70
5.	RESULTADOS:	70
5.1.	<i>Parâmetros de Crescimento de plântulas de milho inoculadas com Azospirillum brasilense FP2:</i>	70
5.2.	<i>Quantificação de DNA de Azospirillum brasilense FP2 em plântulas de milho:</i>	78
5.3.	<i>Expressão Gênica:</i>	92
6.	DISCUSSÃO:	103

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	115
ANEXO I – SEQUÊNCIA DO GENE <i>AZNIFA</i> DE <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> FP2	127
ANEXO II – BLAST DA SEQUÊNCIA DO AMPLICON COM 96 PB DO GENE <i>AZNIFA</i> DE <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i>	130
ANEXO III – .CURVA DE MELTING E CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DA REAÇÃO DE TITULAÇÃO PARA A CONCENTRAÇÃO DE 600 NM DOS INICIADORES <i>AZNIFA</i> – F12 USANDO DNA DE <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> COMO DNA MOLDE.	137

1. Introdução e Justificativa:

Na década de 1960, ocorreu a chamada “Revolução Verde”, que foi um grande crescimento na produção mundial de grãos devido à pesquisa e desenvolvimento nas décadas anteriores de melhores técnicas de plantio. Esse desenvolvimento incluiu a mecanização do plantio e da colheita, a seleção de sementes resistentes a condições locais exclusivas de determinadas regiões, desenvolvimento de fertilizantes específicos para corrigir problemas nutricionais de solo os mais variados possíveis, entre outros (GRIGG, 2001). Contudo, esse nitrogênio mineral presente nos fertilizantes que é adicionado ao solo não é prontamente absorvido pelas plantas (MACHADO *et al.*, 1998) Em condições normais, as plantas absorvem menos de 50% do nitrogênio mineral adicionado dessa forma. Isso ocorre porque parte do nitrogênio é perdido por lixiviação deste na forma de nitrato, volatilização da amônia, e pela emissão de N_2 e óxidos de nitrogênio (BREDEMEIER e MUNDSTOCK, 2000). Esse nitrogênio que se perde por lixiviação acaba por se tornar uma das fontes de poluição dos sistemas vegetais. Além da poluição causada pelo nitrogênio que é lixiviado, há também a poluição gerada pela produção industrial desses fertilizantes, pois envolve o consumo de combustíveis e a emissão de gases para a atmosfera (WEBER e MIELNICZUK, 2009).

Segundo o relatório da Organização das Nações Unidas “World Population Prospects” (UNITED NATIONS, 2009), a população humana continua crescendo a um ritmo que em 2050, em uma hipótese de crescimento moderado, será de, aproximadamente, 9 bilhões de pessoas. Para que toda essa população seja alimentada, se faz necessário que haja um aumento na produção internacional de comida.

Estima-se, para que haja um crescimento na produção de alimentos suficiente para garantir alimento para essa demanda futura, que seja necessário um aumento de 18% no total de terras utilizadas para a agricultura. Como os países desenvolvidos possuem pouca ou nenhuma terra que ainda possa ser convertida em áreas agrícolas, esse aumento deverá ocorrer sobre áreas florestais na América Latina e na África

Subsaariana. Se isto ocorrer, estima-se que será perdido em torno de um terço das florestas tropicais e savanas, além dos serviços ecológicos prestados por essas áreas, como servir de áreas de depósito de carbono (TILMAN *et al.*, 2001)

Dessa forma, esse aumento na produção de alimentos deve ser alcançado, primordialmente, sem aumentar o impacto sobre o meio ambiente ou avançar sobre as florestas prístinas ainda existentes nos trópicos. Assim, o desenvolvimento de novas tecnologias que permitam aumentar a produção mundial de alimentos sem o aumento da área plantada ou o uso de adubos inorgânicos se faz necessário.

Para aumentar a produção de milho, o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal tem se mostrado como uma alternativa viável. Essas bactérias são capazes de estimular um maior crescimento vegetal por meio de interações entre a planta e a bactéria. Segundo (HUNGRIA *et al.*, 2010), a inoculação do milho com *A. brasilense* levou a um aumento de 24 a 30% na produção de grãos de milho. Outra propriedade dessas bactérias é a sua capacidade de produzirem fitormônios, em especial auxinas e etileno. Essa produção tem sido associada aos efeitos benéficos produzidos por *Azospirillum* quando associado a gramíneas e cereais (CASSÁN *et al.*, 2009; PUENTE *et al.*, 2009; BASHAN e DE-BASHAN, 2010).

Assim, como para os próximos anos há a necessidade de aumentar a produção de grãos, entre eles o milho (*Z. mays*), sem aumentar a área plantada, pesquisar como o milho (*Z. mays*) responde durante a interação com *A. brasilense* se torna de grande importância. Assim, o estudo da expressão dos genes dos receptores de etileno, das proteínas responsáveis pelo transporte influxo e efluxo de auxinas e dos genes ligados à resposta da planta a estresses bióticos é uma alternativa viável para verificar como o milho (*Z. mays*) reage durante a colonização por *A. brasilense*, o que permitirá um melhor entendimento da interação entre a planta e a bactéria.

2. Revisão Bibliográfica:

2.1. O Milho (*Zea mays*): Produção e demanda por adubação nitrogenada

O milho (*Zea mays*) é uma planta originada no México e que possui variedades adaptadas a diversos ambientes terrestres e é uma das culturas de maior importância mundial (FORNASIERI, 1992). O Brasil, segundo dados coletados pela Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2011), apresentou, em 2011, a terceira maior produção de milho do mundo, atrás somente de Estados Unidos e China. O milho (*Z. mays*) cultivado no Brasil é insumo para diversos produtos, e seu principal uso (entre 70 e 80%) é como ração para suínos e aves (EMBRAPA INFORMÁTICA AGROPECUÁRIA, 2006). Tal fato é importante na medida em que contribuirá, em último caso, com a alimentação humana, pois ao ser usado como alimento para suínos e aves, esse milho ingerido por estes animais auxiliará na formação das reservas proteicas dos mesmos que serão, após o abate, consumidas por humanos. O milho, além de contribuir de forma indireta na alimentação humana, contribui também de forma direta nesta ao ser consumido *in natura* ou processado. Este apresenta demandas nutricionais específicas para seu sucesso. Assim, para que apresente uma alta produtividade são necessários 104 Kg de nitrogênio por hectare (HUNGRIA *et al.*, 2010).

O nitrogênio é um elemento essencial na constituição de todas as proteínas celulares. Dessa forma, a sua disponibilidade no ambiente em uma forma que possa ser prontamente absorvida e utilizada pelos seres vivos é primordial à manutenção da vida. Assim, o nitrogênio, juntamente com a água, é tido como um fator limitante de crescimento tanto de plantas em ambientes naturais, quanto em plantas cultivadas, como o arroz (*Oryza sativa*) e o milho (*Zea mays*).

Entretanto, a maioria dos estoques de nitrogênio do solo se encontra em uma forma não disponível às plantas (orgânica), dependendo de microrganismos presentes no solo para a conversão deste nitrogênio nas suas formas minerais (NH_4^+ e NO_3^-). Estas formas minerais são as formas prontamente absorvidas pelas plantas (POLETTTO, 2004). Mas essa mineralização do nitrogênio não é suficiente para sustentar as altas demandas deste nutriente pelas culturas comerciais, sendo necessário realizar a adição de nitrogênio mineral (WEBER e MIELNICZUK, 2009),

Contudo, esse nitrogênio mineral adicionado ao solo não é imediatamente absorvido pelas plantas (MACHADO *et al.*, 1998). Em condições normais, as plantas absorvem menos de 50% do nitrogênio mineral adicionado na forma de fertilizantes. Isso ocorre porque parte do nitrogênio é perdido por lixiviação deste na forma de nitrato, volatilização da amônia, e pela emissão de N_2 , e óxidos de nitrogênio (BREDEMEIER e MUNDSTOCK, 2000). Esse nitrogênio que se perde por lixiviação acaba por se tornar uma das principais fontes de poluição dos sistemas vegetais. Além da poluição causada pelo nitrogênio que é lixiviado, há também a poluição gerada pela produção industrial desses fertilizantes, pois envolve o consumo de combustíveis e a emissão de gases para a atmosfera (WEBER e MIELNICZUK, 2009). Dessa forma, o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) é uma alternativa viável para o aumento da produção de culturas comerciais como o milho sem a necessidade de aumentar a aplicação de fertilizantes nitrogenados no solo.

2.2. Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (BPCV):

Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) são um grupo de microrganismos são benéficos às plantas devida à sua capacidade de colonizar a superfície de raízes, a rizosfera, a filosfera e os tecidos internos da planta (HUNGRIA *et al.*, 2010) e de promover o crescimento vegetal destas (VERNA *et al.*, 2010). Essas bactérias são capazes de estimular um maior crescimento vegetal por meio da fixação biológica de nitrogênio, da produção de fitormônios, principalmente ácido indol-3-acético (AIA), vitaminas e fatores de crescimento que acabam por estimular o crescimento vegetal e a produção das plantas. Acredita-se que estas bactérias estimulam o crescimento vegetal por meio da combinação de todos esses mecanismos (BABALOLA, 2010; HUNGRIA *et al.*, 2010) (Figura 1).

As raízes das plantas excretam substâncias que atraem as BPCV para a região da rizosfera. As BPCV, ao chegarem à rizosfera, colonizam esta região e começam a produzir substâncias que acabam por promover o crescimento das plantas (fitormônios, vitaminas, aminoácidos, fatores de crescimento, regulação da produção de etileno) (BABALOLA, 2010).

Os seguintes gêneros possuem membros que fazem parte do grupo das BPCV: *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Derrxia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* and *Zoogloea* (VERNA *et al.*, 2010). Com exceção das bactérias do gênero *Rhizobium*, as mais estudadas dentre as BPCV conhecidas são as pertencentes ao gênero *Azospirillum* (BASHAN e DE-BASHAN, 2010)

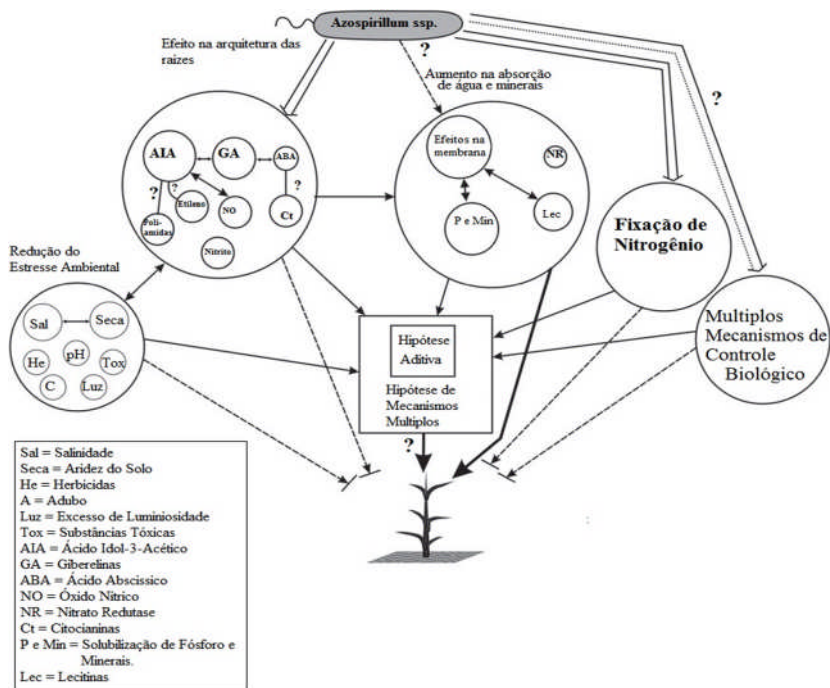


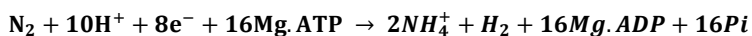
Figura 1. Esquema de como *Azospirillum* influencia o crescimento vegetal (Adaptado de BASHAN e DE-BASHAN, 2010).

2.2.1. *Azospirillum* spp.:

Azospirillum spp. são um gênero de bactérias que são encontradas em praticamente todos os locais do planeta (HUNGRIA *et al.*, 2010). Elas são bactérias Gram-negativas de vida livre que podem ser isoladas na rizosfera de gramíneas e cereais tanto de climas tropicais como de climas temperados (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). Essas bactérias possuem como características principais serem capazes de fixar o nitrogênio gasoso (N_2) e produzirem fitormônios (CASSÁN *et*

al., 2009). *Azospirillum* spp. são capazes de fixar o nitrogênio gasoso (N₂) em condições microaeróbicas e o converter em amônia (NH₄⁺) (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000), que é uma das formas minerais do nitrogênio que é prontamente absorvido pelas plantas (FORNASIERI, 1992). Tal forma mineral é excretada por estas bactérias, o que torna o nitrogênio disponível para as plantas.

Essa fixação de nitrogênio ocorre por meio do complexo da nitrogenase. Esse complexo é formado por duas proteínas: a dinitrogenase redutase (proteína que contém ferro) ou NifH, e a dinitrogenase (proteína que contém um cofator molibdênio-ferro) ou NifDK (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). O complexo da nitrogenase reduz o N₂ a NH₄⁺ como mostra a equação abaixo (HUERGO, 2006):



A proteína NifH se liga a duas moléculas de Mg.ATP, o que altera a conformação desta, e assim permite que NifH se ligue a NifDK. Uma vez formado o complexo da nitrogenase (NifH-NifDK ou NifHDK), NifH transfere um elétron para o cofator MoFe de NifDK. Durante a transferência do elétron, ocorre a hidrólise das duas moléculas de Mg.ATP, liberando dois fosfatos inorgânicos. O Mg.ADP permanece ligado ao NifH oxidado e o complexo da nitrogenase é desfeito. O NifH é reduzido por um doador de elétrons e os dois Mg.ADP são substituídos por mais duas moléculas de Mg.ATP. Por fim o NifH se liga ao NifDK reiniciando o processo. Esta sequência de reações perdura até que sejam transferidos elétrons suficientes para que o N₂ possa ser reduzido a NH₄⁺ (HUERGO, 2006).

Após a redução do N₂ a NH₄⁺ ou da obtenção de amônia a partir do meio, a bactéria assimila essa amônia por meio da produção de glutamina e glutamato, compostos que irão atuar como doadores de nitrogênio nas reações celulares (ARCONDEGUY *et al.*, 2001).

Segundo Machado (1998), em experimentos em que se inoculou plantas de milho com uma mistura de bactérias

promotoras de crescimento vegetal (*A. amazonense*, *A. lipoferum* e *Herbaspirillum seropedicae*) em dois regimes de adubação nitrogenada (10 kg.ha⁻¹ e 100 kg.ha⁻¹), em que se considera as médias dos tratamentos com e sem inoculação, houve aumento no número de grãos, no conteúdo de nitrogênio nos grãos e no total de nitrogênio presente nas plantas. Conforme resultados obtidos por Junior (2008), a inoculação com a bactéria *Azospirillum amazonense* em dois híbridos de milho, sob três regimes de adubação nitrogenada (100% NH₄⁺, 100% NO₃⁻ e sem Nitrogênio), produziram um aumento na quantidade de matéria seca e nitrogênio nas raízes das plantas inoculadas quando comparadas com as não inoculadas.

Além de fixar o nitrogênio atmosférico, essas bactérias também produzem fitormônios (ácido indol-3-acético – AIA; giberelinas – GA₃ – Ácido Abscísico, etileno e poliaminas) que se acredita serem responsáveis, juntamente com a fixação de nitrogênio, por estimular o aumento na massa seca final das plantas (PERRIG *et al.*, 2007; BASHAN e DE-BASHAN, 2010). Por essa razão, desde sua redescoberta na metade da década de 1970, pela pesquisadora Johanna Döbereiner e seus colaboradores (BASHAN e DE-BASHAN, 2010; DÖBEREINER; DAY, 1976), a interação entre a planta e as bactérias do gênero *Azospirillum* e sua capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico tem sido amplamente estudada. Desde então, os trabalhos objetivaram elucidar o funcionamento das vias metabólicas desta bactéria de forma a entender os processos realizados por ela para fixar o nitrogênio atmosférico e para produzir fitormônios (ELMERICH *et al.*, 1997; CASSÁN *et al.*, 2001; MOLINA-FAVERO *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2010).

Assim, estudos mostraram que o triptofano (Trp) é o precursor da síntese de AIA em *Azospirillum brasilense*, sendo a enzima indol – 3 – piruvato descarboxilase (IPDC) a principal responsável por esta síntese, e que baixas concentrações de Trp favorecem a síntese do AIA. Assim, segundo estes estudos, a biossíntese de AIA ocorre quando há limitação nutricional (baixas concentrações de nitrogênio e das fontes de carbono) e a bactéria se encontra associada com as raízes de plantas, o que resulta em baixos níveis de oxigênio e na presença de Trp (Ona, Van Impe *et al.*, 2005). Segundo Ribaudó (2006), o AIA

produzido por *A. brasilense* durante a interação com o tomate, juntamente com o produzido pela planta, é capaz de estimular a síntese de etileno pela planta em níveis que não inibem a elongação da raiz e a formação de raízes laterais. Outros estudos apontaram a capacidade de *A. brasilense* de produzir as formas ativas de giberelinas (GA_1 e GA_3) (BOTTINI *et al.*, 2004; PERRIG *et al.*, 2007) e de realizar a 3 β – hidroxilação das formas inativas das 3 β – deoxi GA presente em raízes (CASSÁN *et al.*, 2001).

Outros estudos focaram na relação da bactéria com a planta, buscando a comprovação de que esta realmente leva a um ganho de massa seca pela planta (JUNIOR *et al.*, 2008). Entretanto, existe uma quantidade menor de trabalhos sobre como a planta responde a esta interação (BASHAN e DE-BASHAN, 2010).

2.2.2. *Azospirillum brasilense* FP2 :

A cepa *Azospirillum brasilense* FP2 é um mutante natural da cepa SP7. *A. brasilense* FP2 é uma cepa fixadora de nitrogênio, resistente aos antibióticos estreptomicina e ácido nalidíxico (PEDROSA e YATES, 1984).

2.3. Fitormônios:

2.3.1. Auxina:

Nos últimos anos, muitos pesquisadores têm estudado os mecanismos de ação dos fitormônios no crescimento e desenvolvimento vegetal. Entre os principais grupos de fitormônios estudados, estão as auxinas (especialmente o ácido indol-3-acético, AIA) e o etileno (BURG e THIMANN, 1959; TANIMOTO *et al.*, 1995; LJUNG *et al.*, 2001; BLAKESLEE *et al.*, 2005; LJUNG e AL., 2005; CARRARO *et al.*, 2006; HIRANO *et al.*, 2008; CHEN e GALLIE, 2010; SIMON e PETRASEK, 2011). As auxinas são um grupo de hormônios vegetais responsáveis por regularem vários aspectos do desenvolvimento vegetal, como o crescimento e a diferenciação celular, estabelecimento da dominância apical – basal, e na formação dos meristemas apical radicular e caulinar (BISHOPP *et al.*, 2006). Pesquisas recentes identificaram diversos aspectos envolvidos na resposta da planta às auxinas (SIMON e PETRASEK, 2011).

As auxinas são sintetizadas, principalmente, nos meristemas apicais e em folhas jovens (TROMAS e PERROT-RECHENMANN, 2010), e também no meristema apical das raízes, especialmente durante a fase de alongação da raiz, entretanto, a raiz ainda depende da auxina produzida nas partes aéreas da planta (LJUNG, Bhalerao *et al.*, 2001; LJUNG e AL., 2005). Nas plantas a principal via de produção do AIA é a partir do aminoácido triptofano (Figura 1). A auxina é transportada pela planta de duas formas: transporte de longa distância e de célula a célula. O transporte de longa distância é feito através do floema e garante um fluxo das regiões de produção para as de consumo. Entretanto este transporte não pode ser precisamente regulado, quando comparado com o transporte célula a célula. O transporte das auxinas célula a célula (ocorre via simplasto), é possível graças às características da auxina (pequeno tamanho e lipofílica) e a proteínas envolvidas no transporte das auxinas para dentro da célula (influxo) e para fora da célula (efluxo). Devido ao pH do apoplasto (oscila entre 5,5 e 5,7), parte da auxina se encontra protonada, o que garante que esta consiga se difundir pela membrana plasmática. Esta difusão é favorecida pelo fato do pH de dentro da célula ser em torno de 7, o que faz com que dentro da célula todas as auxinas estejam na sua forma iônica

(AIA^-). Este fato favorece a difusão da auxina protonada para dentro da célula. Entretanto a maior parte da auxina que se encontra no apoplasto está na forma iônica, e esta, para ser carregada para o interior da célula e depois para fora da mesma, necessita de carreadores que a transportem para o interior (influxo) e para o exterior (efluxo) da célula. Tal fato garante a manutenção do transporte polar da auxina de célula a célula (TROMAS e PERROT-RECHENMANN, 2010).

O transportador influxo de auxina pertence a uma subfamília de proteínas transportadoras do tipo permease: AUXIN1 (AUX1)/Like AUX1 (LAX). Estas proteínas realizam o transporte simporte de AIA^- com o auxílio do gradiente de prótons. (TROMAS e PERROT-RECHENMANN, 2010). A localização de AUX1 na célula depende do tipo celular analisado e, juntamente com os transportadores PIN, é responsável por manter o fluxo direcional intercelular de auxina (PERET *et al.*, 2012). Em milho foi identificado o gene *Zea mays* auxin transporter-like protein 1 (*Zmaux1*) (ALEXANDROV *et al.*, 2009).

Os transportadores efluxo de auxina aniônica são uma família de proteínas conhecidas como proteínas PIN, e são responsáveis pela saída da auxina da célula (Figura 2) (BLAKESLEE, Peer *et al.*, 2005). Em milho foram identificadas as sequências dos genes putativos *Zmpin1a*, *Zmpin1b* e *Zmpin1c* (CARRARO *et al.*, 2006; FORESTAN *et al.*, 2010).

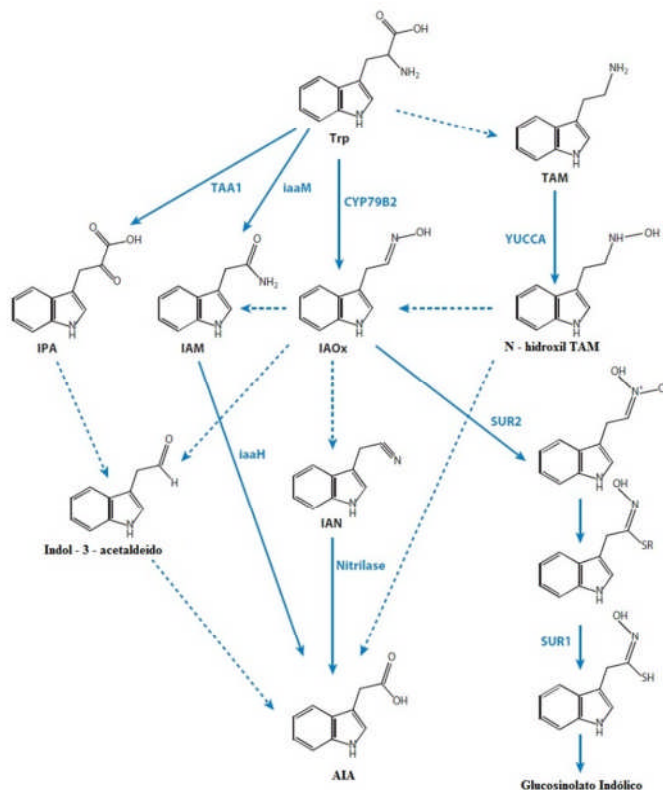


Figura 2. Rota de produção de Ácido Indol - 3 - Acético (AIA) dependente de triptofano. Setas sólidas: os genes responsáveis por esses passos foram identificados em plantas e microrganismos. Setas tracejadas: passos propostos, mas os genes responsáveis por esses passos não foram determinados de forma definitiva. Abreviações: IAox: indol-3-acetaldoxima; IPA: indol - 3 - piruvato; IAM: indol - 3 - acetamida; IAN: indol - 3 - acetonitrila; TAM: triptamina (Adaptado de Zhao(2010)).

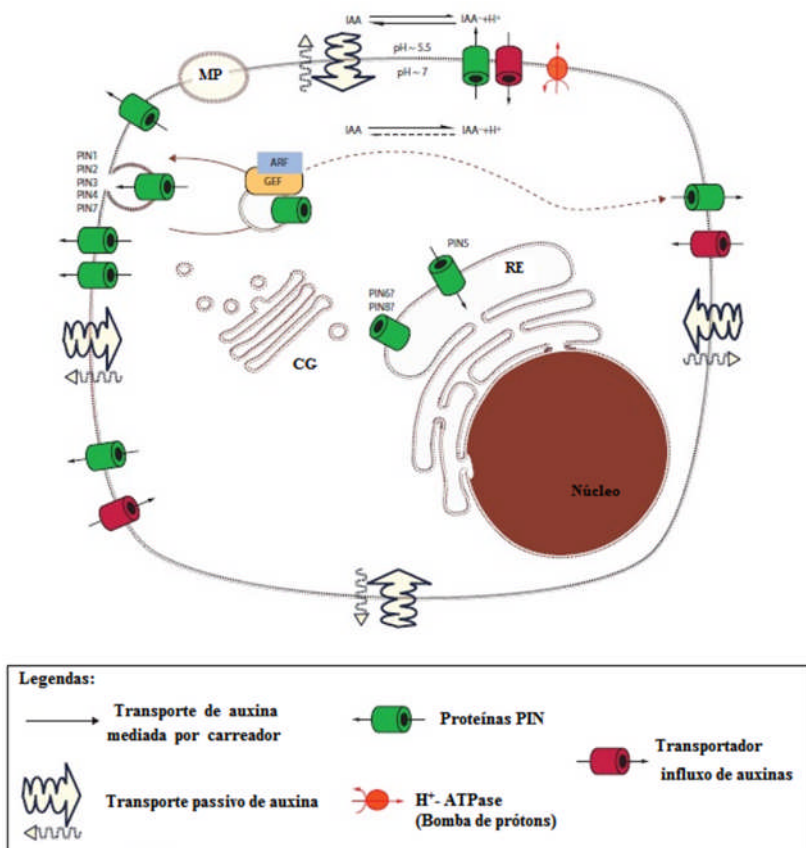


Figura 3. Localização das proteínas PIN na célula vegetal identificadas em *Arabidopsis thaliana*. AIA: ácido indol – 3 – acético. (Adaptado de Křeček (2009). MP: Membrana Plasmática; CG: Complexo de Golgi.

Após entrarem nas células, as auxinas desencadeiam um conjunto de respostas celulares mediadas por um conjunto de proteínas presentes no núcleo da célula vegetal. O receptor de auxina, *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1* (TIR1), interage com a proteína Culina (Cullin), com um tipo de proteína do tipo SKP1 (ASK1/ASK2), e com a proteína RBX para formar o complexo do tipo SCF com atividade ubiquitina ligase. Esse tipo

de complexo transfere uma ubiquitina para a proteína alvo, o que marca esta para ser degradada pela proteinase 26S. O complexo SCF^{TIR1} , quando ligado a auxina, marca para degradação um conjunto de reguladores de transcrição dependentes de auxina (Aux/IAA). Esses reguladores de transcrição, na ausência de auxina, reprimem a atividade transcricional de FATORES DE RESPOSTA A AUXINA (AUXIN RESPONSE FACTORS – ARF, em inglês). Assim, na presença da auxina, a Aux/IAA é marcada para degradação pelo complexo SCF^{TIR1} , o que libera ARF para promover a transcrição dos genes associados à resposta a auxina (Figura 3) (BISHOPP *et al.*, 2006)

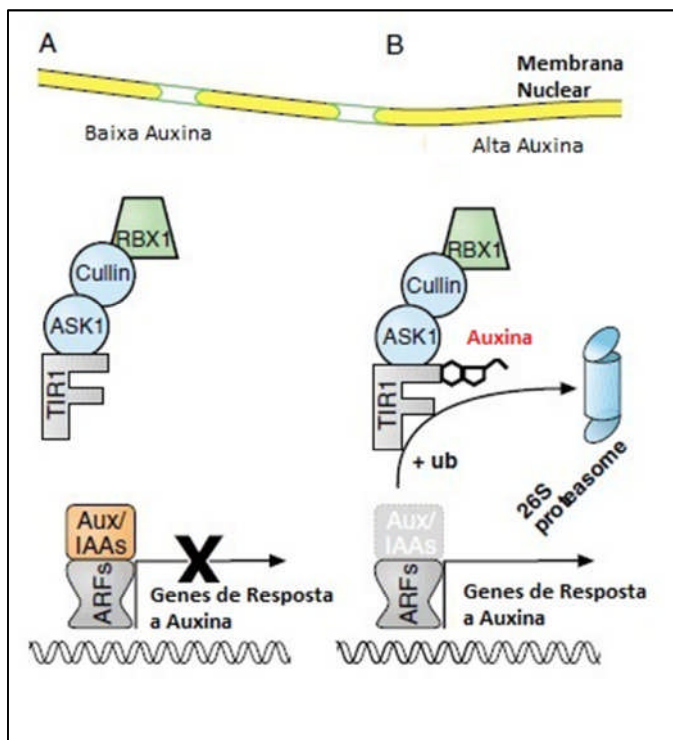


Figura 4. Mecanismo de ação das auxinas (Adaptada de. BISHOPP (2006)).

2.3.2. Etileno:

O etileno é um fitormônio sintetizado em todas as partes da planta a partir do aminoácido metionina. A partir deste aminoácido é produzido o ácido 1- aminociclopropano – 1 – carboxilato (ACC), que é o precursor imediato do etileno. A metionina é regenerada a partir do ciclo de Yang (Figura 4). Este fitormônio atua em diversos momentos do desenvolvimento vegetal, como na resposta a estresses ambientais e na formação de pêlos radiculares (RIBAUDO *et al.*, 2006). A resposta da célula vegetal ao etileno está relacionada com a presença de receptores de membrana que funcionam como reguladores negativos à resposta ao etileno. Esses receptores, quando ligados ao etileno, inativam a enzima CTR1, o que permite a expressão de genes envolvidos na resposta ao etileno (Figura 5) (WANG *et al.*, 2002; BISHOPP *et al.*, 2006).

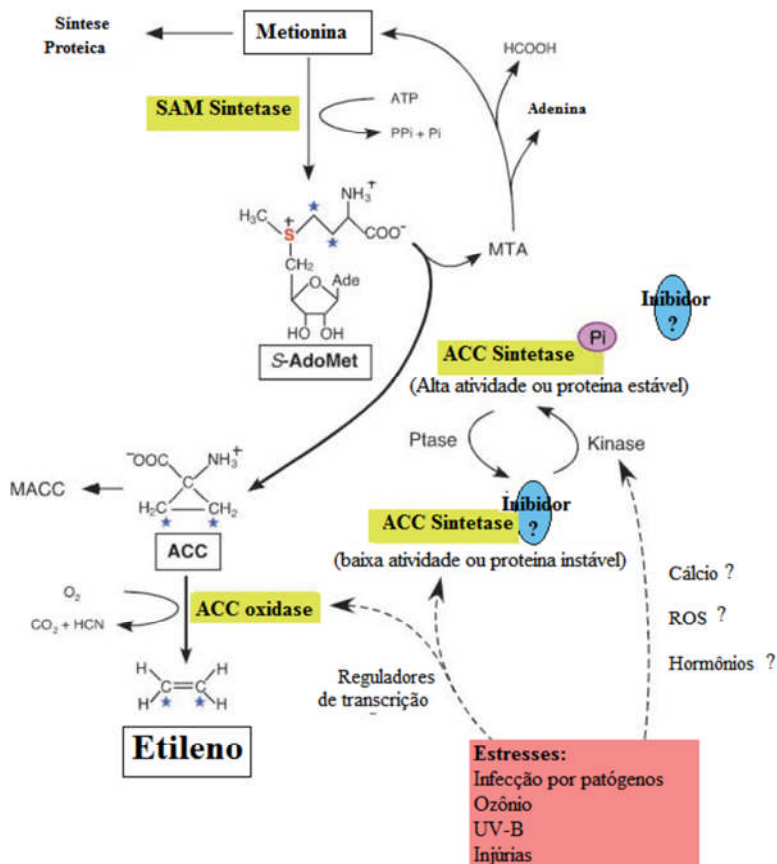


Figura 5. Síntese do etileno nas células vegetais e a regulação de sua produção. MTA = 5 - metiltioadenosina; SAM = S - AdoMet. (adaptado de (WANG *et al.*, 2002).

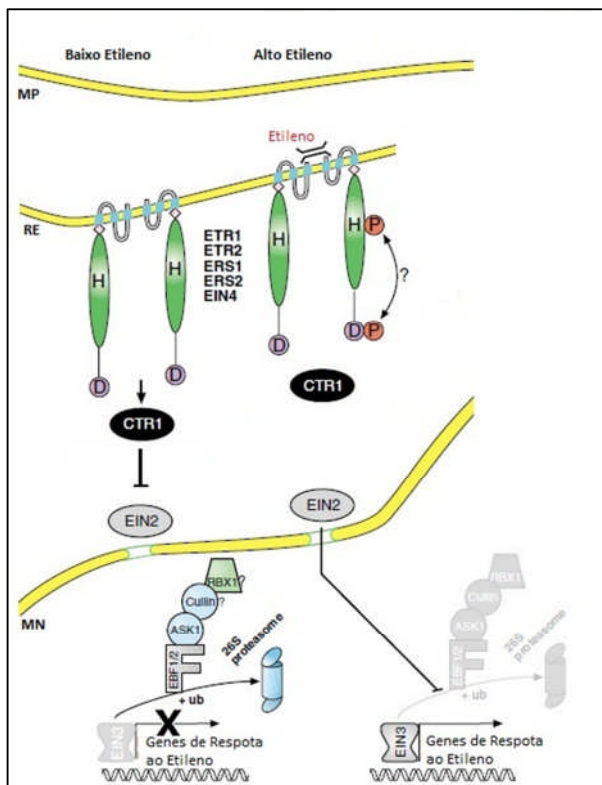


Figura 6. Mecanismo de resposta dos receptores de etileno (Adaptado de BISHOPP (2006)).

Em milho (*Z. mays*) foram identificados dois receptores para etileno, *ZmERS1* (*Zea mays* ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1) e *ZmETR2* (*Zea mays* ETHYLENE RESPONSE 1), que são codificados pelas sequências *ZmERS1a* e *ZmERS1b*, e *ZmETR2a* e *ZmETR2b* (CHEN e GALLIE, 2010). Esses receptores, quando ligados ao etileno, permitem a expressão de genes ligados à resposta ao etileno (GALLIE e YOUNG, 2004)

Além de atuarem isoladamente em diversos processos do desenvolvimento vegetal, estes dois hormônios também atuam de forma conjunta em alguns processos do desenvolvimento

vegetal. A alteração nos gradientes de auxina e etileno controla o processo de abscisão foliar. Inicialmente a folha se mantém sadia e funcionalmente ativa. Durante esta fase os altos níveis de auxina produzidos pela folha diminuem a sensibilidade da zona de abscisão ao etileno, o que faz com que esta permaneça funcional. Uma redução nos gradientes de auxina, provavelmente associados ao processo de senescência foliar, faz com que a zona de abscisão se torne mais sensível ao etileno, o que desencadeia o início do processo de abscisão foliar. Essa diminuição do gradiente de auxina na folha leva a um aumento na síntese deste hormônio pelas células da zona de abscisão. Por fim, em resposta ao etileno produzido endogenamente, as células da zona de abscisão sintetizam e secretam celulase e outras enzimas responsáveis por digerir a parede celular das células da zona de abscisão, o que leva à queda da folha (TAIZ e ZEIGER, 2009)

Foi demonstrado em tomate que inibidores de etileno são capazes de reduzir a curvatura gravitrópica e que baixas concentrações deste hormônio reestabelecem a curvatura normal em tomates selvagens, e que baixas concentrações de etileno são suficientes para reestabelecer a curvatura normal de mutantes de tomate *diageotropica (dgt)*, que são insensíveis à auxina. Também foi relatado que em mutantes *dgt* de tomate, durante a elongação do caule, a sensibilidade ao etileno está aumentada enquanto que nas raízes esta se encontra diminuída quando comparadas com o tipo selvagem. Sabe-se que o transporte simplástico de auxina é influenciado pelo etileno, e se propôs que o sítio de ação do etileno na inibição do crescimento de raízes seria os transportadores efluxo de auxina. Por fim, se sabe que a auxina estimula o acúmulo do mRNA de ACC sintetase (ACS), responsável por converter o ACC em etileno (BAULY *et al.*, 2002).

2.3.3. Giberelinas:

As giberelinas são um grupo de fitormônios responsáveis por controlar diversos aspectos do desenvolvimento das plantas, entre eles a germinação de sementes, a expansão foliar, alongação do caule, florescimento e o desenvolvimento das sementes. As giberelinas são um grande grupo de fitormônios tetracíclicos diterpenóides. A síntese destes hormônios pode ser dividida em sete etapas (Figura 6) (SONG *et al.*, 2011). Se inicia com a conversão de geranilgeranil difosfato (GGPP) em *ent*-copalil difosfato nos plastídios pela enzima *ent*-copalil difosfato sintetase (CPS), seguido por sua conversão em *ent* – caureno pela *ent* – caureno sintase (KS). Após isso, no retículo endoplasmático, *ent* – caureno oxidase (KO) converte o *ent* – caureno a ácido *ent* - caurenóico. Feito isso, a enzima ácido *ent* - caurenóico oxidase (KAO) converte o ácido *ent* - caurenóico em GA_{12} . Em algumas plantas, GA_{12} é convertido em GA_{53} pela hidroxilação do carbono 13 pela enzima GA_{13} – oxidase ($GA_{13}ox$). Nessas plantas, GA_{53} é convertido em GA_{20} pela enzima GA_{20} – oxidase ($GA_{20}ox$), e depois convertido na forma ativa GA_1 pela enzima GA_3 – oxidase ($GA_{3}ox$). Nas demais plantas, GA_{12} é convertido a GA_9 por $GA_{20}ox$, e depois convertido na forma ativa GA_4 por $GA_{3}ox$. Por fim, GA_1/GA_4 são convertidas às suas formas inativas GA_8/GA_{34} pela enzima GA_2 – oxidase ($GA_{2}ox$) (YAMAGUCHI e KAMIYA, 2000; SONG *et al.*, 2011).

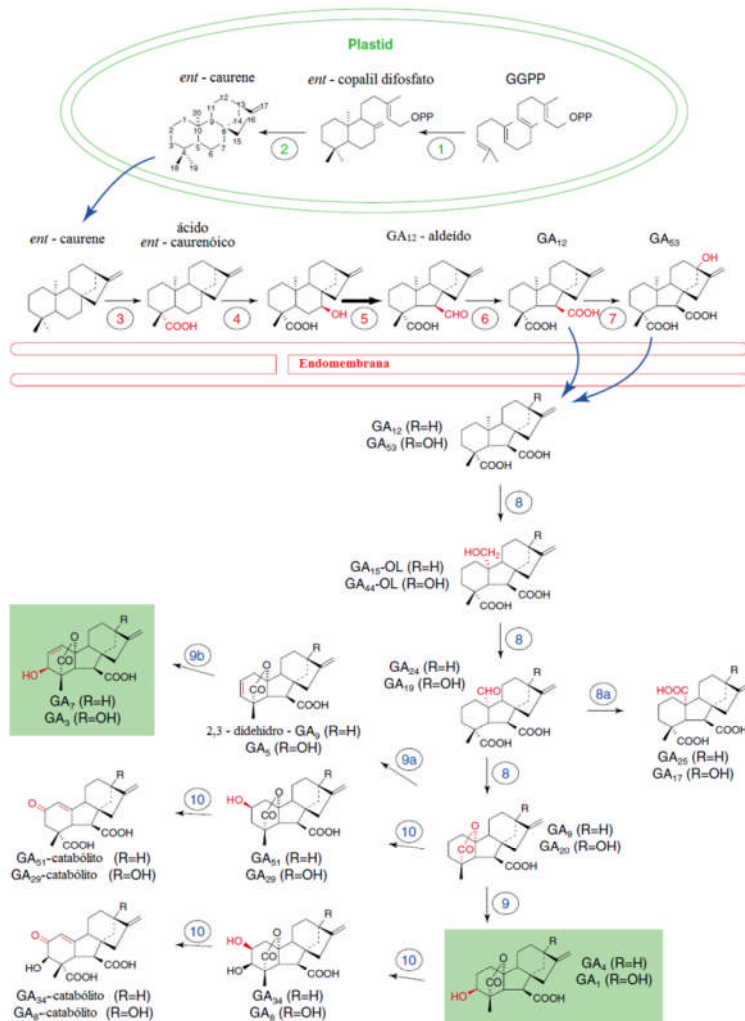


Figura 7. Via de síntese de giberelinas em plantas (Adaptado de HEDDEN e PHILLIPS (2000)).

2.4. Via de Sinalização MAP quinase (MAPK):

No curso da evolução, as plantas desenvolveram mecanismos que as permitem, de forma rápida, identificar e responder a estímulos ambientais, bióticos e abióticos por meio de respostas adaptativas ou defensivas. Nas células eucarióticas, as vias metabólicas formadas por proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) tem um papel importante na transdução de sinais na célula envolvidos no crescimento, diferenciação, proliferação, morte e resposta a estresses (patógenos, drogas, salinidade, frio, lesões, espécies reativas de oxigênio) (ZHANG *et al.*, 2006; SAMAJOVA *et al.*, 2012).

Estas proteínas se encontram agrupadas em módulos compostos pelas proteínas MAPK quinase quinase (MAPKKK, MAP3K ou MEKK), MAPK quinase (MAPKK, MAP2K ou MEK) e MAPK (Figura 7) . As proteínas individuais que fazem parte desses módulos são ativadas por fosforilação reversível, e acredita-se que são mantidas unidas em complexos proteicos por proteínas andaime (*scaffold proteins*, em inglês). Esse complexo proteico, aliados à sua localização e compartimentalização na célula (por exemplo, em endomembranas) e aos constituintes individuais de cada complexo (MAPK individuais que são liberados do complexo e são relocadas para o núcleo), poderia garantir certa especificidade para as várias rotas de sinalização e talvez evitar que ocorra o *cross-talk* entre vias de sinalização distintas. Depois de ativadas, muitas MAPK são relocadas para o núcleo, onde irão regular a ação de fatores de transcrição e, conseqüentemente, a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento da planta ou de resposta ao estresse. As MAPK das plantas também são responsáveis, no citoplasma, por regular, entre outras, as proteínas envolvidas na remodelação do citoesqueleto (SAMAJOVA *et al.*, 2012).

Neste contexto, recentemente foi identificada uma MAPK de 46 kDa de milho (*Z. mays*) envolvida na defesa antioxidante induzida por ácido abscísico (ABA) e que age a jusante da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Zhang, Jiang *et al.*, 2006). Essa MAPK foi identificada como sendo *Zmmpk5*

(Ding, Zhang *et al.*, 2009). Estudos posteriores mostraram que a produção inicial de H_2O_2 apoplástico induzida por brassinoesteróides, um grupo de fitormônios, ativa ZmMPK5, o que leva à estimulação dos sistema de defesa antioxidante em folhas de milho. Essa ativação também é responsável por induzir a expressão do gene da NADPH oxidase, o que leva ao aumento do acúmulo de H_2O_2 em folhas de milho (ZHANG *et al.*, 2010).

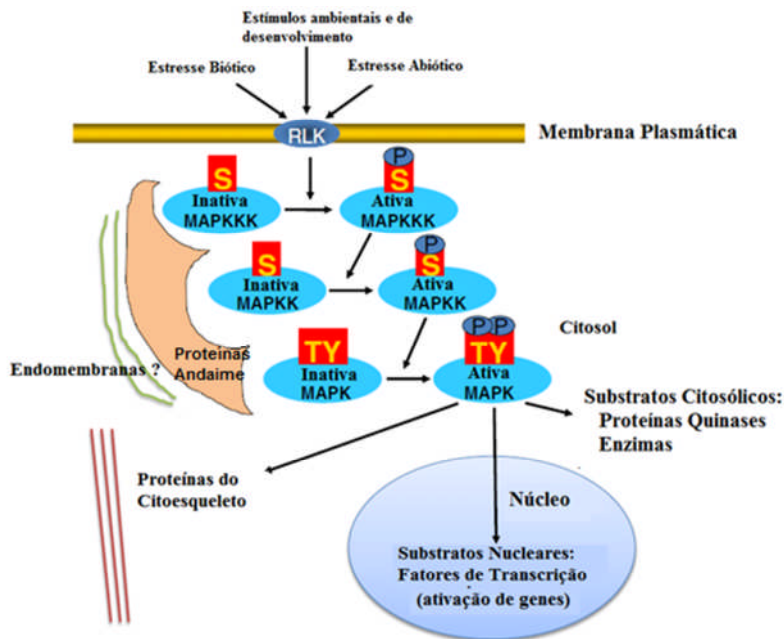


Figura 8. Modelo representativo da organização subcelular dos módulos das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e seus alvos (SAMAJOVA *et al.*, 2012).

2.5. NADPH oxidase:

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são produtos formados a partir da redução incompleta do oxigênio a água em processos metabólicos aeróbicos, como a fotossíntese e a respiração. São elas o superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot) (LAMB e DIXON, 1997; MARINO *et al.*, 2012). As ROS são compostos perigosos para a planta e sua produção em excesso pode levar a alterações no estado redox das células vegetais, situação conhecida como “estresse oxidativo”, que pode inclusive causar a morte celular. Essas alterações são geralmente causadas por respostas da planta a estímulos ambientais (MARINO *et al.*, 2012).

Para evitar a ocorrência de alterações no estado redox da célula, as plantas fazem uso de complexas ferramentas moleculares para manter o estado redox em homeostase. Apesar do perigo que estes compostos representam, sabe-se atualmente que as ROS são compostos chave em vários processos celulares, como fechamento dos estômatos, respostas às mudanças ambientais e como moduladores da atividade proteica ou da expressão gênica. Esses compostos são propositadamente produzidos pelas células vegetais por meio de complexos enzimáticos. Entre as enzimas presentes nesses complexos, se encontram as NADPH oxidases (NOX), que são as enzimas produtoras de ROS mais estudadas atualmente. As enzimas NOX de plantas são conhecidas como *respiratory burst oxidase homologues* (RBOH) e são homólogas à subunidade catalítica da NOX dos fagócitos de mamíferos. Em plantas essas enzimas funcionam como doadores citoplasmáticos de elétrons para o O_2 extracelular (MARINO *et al.*, 2012).

Ao longo do curso da evolução, as plantas se especializaram em usar as ROS como moléculas transdutoras de sinais de estresse, e, dessa forma, uma resposta única de genes sensíveis a ROS é induzida por cada tipo de estresse biótico ou abiótico a que a planta é submetida. O H_2O_2 é produzido por NOX ligadas à membrana logo em seguida à infecção por patógenos ou devido a feridas produzidas na planta. Este peróxido de hidrogênio produzido rapidamente se difunde pelas

células e ativa várias defesas da mesma (ATKINSON e URWIN, 2012).

3. Objetivo Geral

Estudar o efeito da inoculação com *A. brasilense* FP2 no crescimento de plântulas de milho (*Z. mays*) e na expressão dos genes dos receptores de etileno, dos transportadores efluxo e influxo de auxina, dos genes envolvidos no *burst* oxidativo, na síntese de giberelinas e da via de sinalização MAPK. Bem como quantificar o DNA bacteriano em plântulas inoculadas.

3.1. Objetivos Específicos

- 1) Avaliar o efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* FP2 no desenvolvimento de duas variedades de milho (DKB240 e Pioneer 30F53), avaliar o comprimento das folhas e das raízes, e a quantidade de raízes laterais.
- 2) Avaliar os efeitos da inoculação de plântulas de milho com *A. brasilense* FP2 na expressão dos genes *Zmpin1a*, *Zmpin1b* e *Zmpin1c* (responsáveis pelo transporte de auxinas), *Zmaux1* (Transportador influxo de auxina), *Zmers1a* e *Zmers1b*, e *Zmetr2a* e *Zmetr2b* (receptores de etileno), *Zmga20ox* e *Zmko1* (enzimas envolvidas na síntese de giberelinas), *ZmrbohA* e *ZmrbohB* (enzimas envolvidas no *burst* oxidativo), e de *Zmmpk5* (enzima pertencente à via de sinalização por MAP quinase).
- 3) Realizar a quantificação por PCR em tempo real do DNA de *Azospirillum brasilense* a partir de extrações de DNA total de raiz e parte aérea de plântulas de milho.

4. Material e Métodos

4.1. Cepa Bacteriana e Sementes

As sementes de milho Pioneer variedade 30F53 e a cepa bacteriana *Azospirillum brasilense* FP2 foram cedidas pelo professor Fábio Oliveira Pedrosa (Universidade Federal do Paraná). As sementes de milho variedade DKB240 foram cedidas pela Dekalb. *A. brasilense* FP2 é uma cepa fixadora de nitrogênio, resistente aos antibióticos estreptomicina e ácido nalidíxico. Esta bactéria foi estocada em meio semi-sólido NFb/lactato a temperatura ambiente (PEDROSA e YATES, 1984).

4.2. Crescimento Bacteriano

Para a realização dos experimentos, *A. brasilense* FP2 foi crescido em meio líquido NFbHP/lactato a 30 °C e 120 rpm em shaker orbital por 24h.

4.3. Inoculação de Milho por *Azospirillum brasilense* FP2

Este experimento foi realizado com duas variedades de milho (DKB 240 e Pioneer 30F53) com três repetições biológicas para cada variedade. Antes de iniciar o experimento, as sementes foram esterilizadas. Para cada 100 mg de sementes de milho, estas foram deixadas por 3 min. em álcool 70%, depois por 30 min. em solução com 40 mL de hipoclorito a 2% e 1 mL TWEEN, e, por fim, 3 lavagens de 1 min. cada em água destilada

estéril. Feita a esterilização, as sementes eram deixadas por 1 h em uma solução contendo 1750 μL de água destilada estéril e 250 μL do fungicida Vitamax®. Após isso, era realizada 3 lavagens sucessivas em água destilada para se retirar o excesso de fungicida. Depois destas lavagens, para ambas as variedades, em cada repetição foram germinadas 96 sementes por três dias em rolos de germinação umedecidos com água destilada estéril. Após esse período, as plântulas foram transferidas para tubetes de plástico com areia de filtro de piscina previamente autoclavados por 1 hora a 120 °C . As plântulas foram divididas em dois grupos experimentais, um formado pelas plântulas inoculadas e outro formado pelas plântulas não inoculadas (que não receberam as bactérias), sendo que cada grupo foi formado por 48 sementes germinadas (Figura 08).

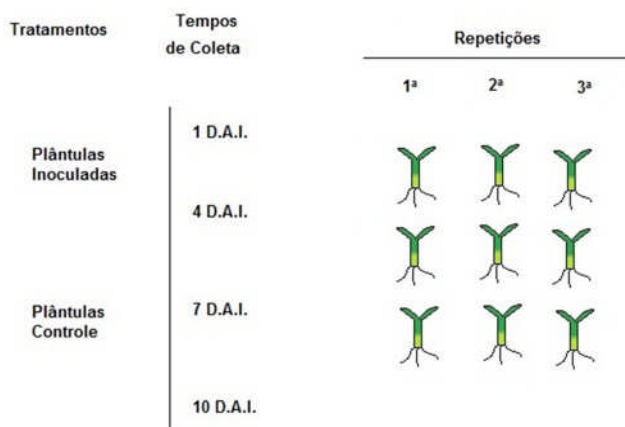


Figura 9. Desenho Experimental de inoculação de plântulas de milho com *Azospirillum brasilense* FP2. Foram coletadas 9 plântulas por grupo experimental para cada um dos tempos de coleta. O experimento foi realizado em triplicata.

As plântulas foram inoculadas com a bactéria *Azospirillum brasilense* FP2 que foi crescida em meio líquido NFb/lactato (PEDROSA e YATES, 1984) a 30 °C e 120 rpm em shaker

orbital. As plântulas da variedade Pioneer 30F53 foram inoculadas com 1 mL de meio de cultura contendo 10^8 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de bactérias da estirpe *Azospirillum brasilense* FP2, e as da variedade DKB 240 foram inoculadas com 1 mL de meio de cultura contendo 10^5 UFC desta bactéria.

Para o experimento com a variedade DKB 240, inicialmente foi realizado o crescimento das bactérias e depois transferiu-se 2 mL desse meio com bactérias para um novo meio NFbHP/lactato, em que as bactérias cresceram, nas mesmas condições anteriores, até atingir a concentração de 10^8 UFC por mL de meio ($DO_{600}=0,8$). Após isso, foi preparado um meio de cultura NFb/lactato com 1 mL de meio para cada semente germinada do grupo das plântulas inoculadas. Esse meio serviu como inoculante após receber as bactérias. Assim, foi transferido 1 μ L do meio de cultura com bactérias (10^8 UFC/ mL de meio) para cada 1 mL de meio do inoculante. Feito isso, cada plântula do grupo das plântulas inoculadas recebeu 1 mL do inoculante. Assim, cada plântula foi inoculada com 10^5 bactérias da estirpe de *A. brasilense* FP2 (BALSANELLI *et al.*, 2010).

Já para o experimento com a variedade Pioneer 30F53, após se realizar o crescimento das bactérias, foi preparado um meio de cultura NFb/lactato contendo 1 mL de meio para cada semente germinada do grupo das plântulas inoculadas. Esse meio serviu como inoculante após receber as bactérias. Assim, foi transferido 2 mL do meio de cultura com bactérias para o inoculante, onde as bactérias cresceram até que atingissem a concentração de 10^8 UFC ($DO_{600} = 0,8$) por mL. Feito isso, cada plântula do Grupo Tratamento foi inoculada com 1 mL do inoculante. Com isso, cada plântula foi inoculada com 10^8 bactérias das estirpes de *A. brasilense* FP2 (VENDAN e THANGARAJU ,2007; MONTEIRO *et al.* ,2008; ambos com modificações).

Em ambos os experimentos, os tubetes com as plântulas inoculadas e não inoculadas foram transferidos para uma sala de crescimento onde foram mantidas com temperatura e luminosidade controladas (25 °C, 16 h de luz e 8 h de escuro). Foi usado Plant Medium (EGENER *et al.*, 1999) como fonte de

nutrientes para a planta durante o experimento. Com 1, 4, 7 e 10 dias após a inoculação foram coletadas nove plântulas por grupo. Com o auxílio de uma régua (precisão de 0,1 cm), foi medido o comprimento da parte aérea e das raízes de nove plântulas. Foi também determinada a produção de massa fresca, com o auxílio de uma balança semi-analítica Shimadzu, e contado o número de raízes laterais das mesmas. Feito isso, as raízes e a parte aérea das plântulas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer a -80°C para posterior extração de RNA e DNA (Figura 9).

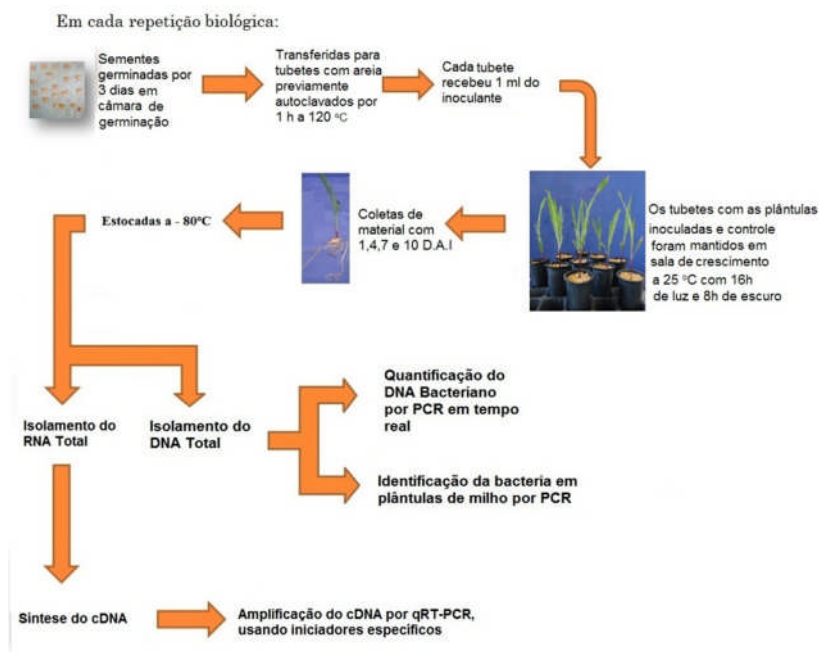


Figura 10. Fluxograma de processo de inoculação de plântulas de milho, isolamento do DNA e do RNA e quantificação dos transcritos por qRT-PCR e do DNA bacteriano por qPCR.

4.4. Extração do DNA de *A. brasilense* FP2:

Para realizar a extração do DNA de *A. brasilense* FP2, inicialmente foi realizado o crescimento das bactérias e depois transferiu-se 2 mL desse meio com bactérias para um novo meio NFbHP/lactato, onde elas cresceram, nas mesmas condições anteriores até atingir a $DO_{600} = 0,8$. Após isso, transferiu-se 2 mL do meio com bactérias para um tubo eppendorff de 2 mL. Após a centrifugação por 3 min a 6.000 g e descarte do sobrenadante, o precipitado foi ressuspenso em 100 μ L de água MilliQ e as amostras foram mantidas à -80°C por 20 min e transferidas para banho – maria a 100°C por 10 min. Após o choque térmico para rompimento da membrana bacteriana, utilizou-se o Kit de extração “DNA Wizard” (PROMEGA®) conforme orientações do fabricante. A pureza e a concentração do DNA extraído foram determinadas em NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA).

4.5. Extração do DNA total de Milho:

Para se extrair o DNA total presente na parte aérea e nas raízes de plântulas de milho (*Z. mays*) inoculadas e não inoculadas com a bactéria *A. brasilense*, foi utilizado o “DNeasy Plant Mini Kit” com as seguintes modificações (Dinon, De Melo *et al.*, 2008): macerou-se 0,1 g de raiz ou da parte aérea de milho em um cadinho com nitrogênio líquido, depois adicionou-se 350 μ L de CTAB e 150 μ L de água MilliQ e transferiu-se o volume para um tubo eppendorff novo de 1,5 mL. Depois se adicionou 5 μ L de RNase A (100 mg/mL) e deixou-se a amostra por 15 min. em banho-maria a 65°C . Após isso, foi adicionado 20 μ L de Proteinase K (20 mg/mL) e deixou-se a amostra de 15-20 min em banho-maria a 65°C . Deste ponto em diante se seguiu o protocolo do fabricante. Nesta extração foram utilizadas as raízes ou a parte aérea de milho inoculado e não inoculado 1, 4, 7 e 10 D.A.I. . A pureza e a concentração do DNA extraído foram

determinadas em NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA).

4.6. Iniciadores utilizados para detectar *Azospirillum brasilense* em amostras de milho:

Os pares de iniciadores utilizados para amplificar o gene *AznifA* foram sintetizados de acordo com Shime-Hattori (2011). Iniciadores para quantificação por PCR em tempo real foram desenhados para o mesmo gene alvo bacteriano *AznifA* (Tabela1 e Anexo I).

Tabela 1. Iniciadores utilizados para detecção do gene *AznifA* da bactéria *A. brasiliense*.

Iniciadores	Sequência (5'a 3')	Tamanho do Amplicon (pb)	Referência
AznifA-A(F) AznifA-A(R)	AACGGCGGATCATCCTCCGGCAT TGGTCAGCAGTTCCAGGTTCCGACG	439	Shime-Hattori, <i>et al.</i> , (2011)
AznifA-B(F) AznifA-B(R)	CCCGATCAACGACGTGGTCTG GCCTCCTCCAGGTTCAAGTTGGTG	455	
<i>AznifA-F19</i> (F)	GTCAGTTATTAGCTGTTTGACGGTAGA	180	Este Trabalho (n° de acesso no Genbank AF288483.3)
<i>AznifA-F19</i> (R)	GCGTGCTTCCGTGACAAGT		
<i>AznifA-F12</i> (F)	CGCAGCAACTGATATGCAAAA	96	
<i>AznifA-F12</i> (R)	GCGTGCTTCCGTGACAAGT		

4.7. Condições da PCR convencional:

A PCR para a amplificação dos fragmentos do gene *AznifA* foi conduzida de acordo com Shime-Hattori (2011), com as seguintes modificações: 12,5 µL de PCR Master mix da PROMEGA®, e 50ng de DNA molde, em um volume final de 25 µL de acordo com as condições descritas em Shime-Hattori (2011). Para testar a especificidade destes iniciadores, se utilizou como controle negativo o DNA de *Herbaspirillum seropedicea* Smr1 extraído como apresentado acima para *A. brasilense*. Em paralelo à PCR com as amostras de raízes e da parte aérea foi utilizada uma amostra de grão de milho previamente extraído como controle negativo.

A amplificação do gene de zeína de milho foi feita de acordo com (DINON *et al.*, 2008).

4.8. Condições da PCR quantitativa (qPCR) :

Após a titulação do iniciador *AznifA-F12* para determinar a melhor concentração para a realização da PCR em tempo real, curvas de validação foram realizadas com diluição seriada de DNA extraído de *Azospirillum brasilense* FP2 a partir de 30 ng de DNA molde. As reações foram realizadas utilizando SYBR Green I PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Com a finalidade de determinar a repetibilidade do experimento, se calculou a eficiência de 3 curvas independentes a partir de 3 extrações de DNA total de *Azospirillum brasilense* FP2. Para este fim, o DNA total obtido nas 3 extrações foram diluídos 1:10 partindo de uma quantidade inicial de 30 ng de DNA de uma amostra, analisada na placa em triplicata, com o objetivo de determinar a eficiência das amplificações. Essa quantidade inicial de DNA bacteriano equivale a 10^5 cópias de DNA (1 cópia = $8,25 \times 10^{-6}$ ng). As reações de amplificação das amostras foram realizadas em triplicata, em poços adjacentes de uma mesma placa, nas seguintes condições de temperatura: 95°C por 10 min,

seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15s e 60 °C por 1 min. Imediatamente após os ciclos, foi produzida uma curva de dissociação com aumento linear de 60°C a 95°C, realizado no ABI PRISM™ 7500 detection system. A quantificação absoluta do número de cópias presentes foi realizada por meio do programa que acompanha a ABI PRISM™ 7500 detection system a partir de uma curva padrão analisada em paralelo com as amostras.

4.9. Extração do RNA total e síntese do cDNA:

Para a extração do RNA da parte aérea e das raízes das plântulas, foram realizadas três extrações por tempo de coleta, uma de cada replicata biológica, para cada tratamento. O RNA total foi isolado a partir de aproximadamente 0,1 g de material vegetal retirado de um *pool* de nove plântulas usando o RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Chatswort, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do RNA extraído foi determinada em NanoDrop ND 2000 Spectrophotometer (Thermo FisherScientific, Wilmington, DE, USA). Essas amostras de RNA foram tratadas com DNase I Amplification Grade (Sigma) para a remoção da contaminação por DNA. Após nova quantificação, a transcrição reversa foi realizada com aproximadamente 2 µg de RNA, iniciadores oligo(dT) (10 µM) e o High Capacity cDNA Archive Kit (Life Technologies) de acordo com as orientações do fabricante.

4.10. Iniciadores utilizados em qRT – PCR:

Os pares de iniciadores utilizados para quantificar os transcritos por qRT – PCR dos genes de milho (*Zea mays*) α – tubulina (*Zmtub*), β – actina (*Zmact*), auxina -1 (*Zmaux1*), giberelina 20 oxidase (*Zmga20ox4*), *ent*-kaurene oxidase (*Zmko1*), proteína quinase ativadora de mitose (*Zmmpk5*), as enzimas relacionadas ao *burst* oxidativo respiratório (*ZmrbohA*, *ZmrbohB*), o do carreador efluxo de auxina (*Zmpin1a*, *Zmpin1b*, *Zmpin1c*), e dos receptores de etileno (CHEN e GALLIE, 2010) foram sintetizados de acordo com as referências indicadas (tabela 2).

Tabela 2. Iniciadores usados para qRT-PCR na análise de expressão gênica

Genes de milho (<i>Zea mays</i>)	Siglas	Sequência (5'a 3')	Nº de Acesso do GenBank.	Referência
<i>alfa tubulina</i>	<i>Zmtub</i>	GCGACCATCCAGTTCGT CTGGTAGTTGATTCGCACTTG	X73980	SUI <i>et al.</i> (2008)
<i>beta actina</i>	<i>Zmact</i>	GCAGCATGAAGGTTAAAGTGATTG GCCACCGATCCAGACACTGT	NM_001155179.1	MELLO <i>et al.</i> , (2012)
<i>Zea mays auxin transporter-like protein 1</i>	<i>Zmaux1</i>	CGAAACGCACCCTGCATT CCCGCTTTTACAGTGGAAAGAT	NM_001158094.1	AMARAL, <i>et al</i> *
<i>Giberelina 20 oxidase 4</i>	<i>Zmga20ox4</i>	GAGAGGTTCTCCATGCCCTA AAGAAAGTCGCCCCAGTTGTA	NM_001156071	SONG <i>et al.</i> , (2011)
<i>ent-kaurene oxidase</i>	<i>Zmko1</i>	CAATCTGTACGGGTGCAACA CCTCTAGGTGCGAGGTACACAT	BT042205	ZHANG <i>et al.</i> , (2010)
<i>proteína quinase ativadora de mitose5</i>	<i>Zmmpk5</i>	TCTGCTCGGCGGTCAACT AAGGCGTTGGCGATCTTCTT	AB016802	

* artigo submetido

Tabela 2 (Continuação).

Genes de milho (<i>Zea mays</i>)	Siglas	Sequência (5'a 3')	Nº de Acesso do GenBank.	Referência
<i>respiratory burst oxidase homologues A</i>	ZmrbohA	CACACGTGACCTGCGACTTC CCCCAAGGTGGCCATGA	DQ855284	ZHANG et al., (2010)
<i>respiratory burst oxidase homologues B</i>	ZmrbohB	GGCCAGTACTTCGGTGAAACA ATTACACCAGTGATGCCCTTCCA	EU807966	
<i>Provável transportador efluxo de auxinas em milho (Zea mays) (PIN1a)</i>	Zmpin1a	GCAGGGCAAGGCGAACAAGTACGGCCAG GGCGACGGCCATGCGGACCTCCTTGAC	DQ836239	FORESTAN et. al. (2010); CARRARO, et. al. (2006)
<i>Provável transportador efluxo de auxinas em milho (Zea mays) (PIN1b)</i>	Zmpin1b	CCGACCCGTGGGTGATGGCAATGGCA CTCAAGCCCATCAAACCTCCGGAGGTGAGC	DQ836240	

Tabela 2 (Continuação).

Genes de milho (Zea mays)	Siglas	Sequência (5'a 3')	Nº de Acesso do GenBank.	Referência
Provável transportador efluxo de auxinas em milho (Zea mays) (PIN1c)	Zmpin1c	TGACCGTCTCATCCCCCATGGAGTCGAGG ATCTCTCCTGTCATAAAGTCAGAATGG	EU570251	FORESTAN et. al. (2010); CARRARO, et. al. (2006)
ceptor de etileno em milho (Zea mays) B73 (ERS14)	Zmers1a	GAGTTAGTCCTCAGGATCTACCTCATGT CAACTCAATCCGCTGGTAGGACATACT	AY359577	
Receptor de etileno em milho (Zea mays) B73 (ERS25)	Zmers1b	GAGTTAGTCCTCAGGATCTACCTCATGT CAATTCAATCCGCTGGTAGCATATGT	AY359578	CHEN e GALLIE, 2010; GALLIE, 2004
Receptor de etileno em milho (Zea mays) B73 (ETR9)	Zmetr2a	GCTATGTATGTGTGAAATTTGAGATTAGGA AGCTAACCTGGCAGAAATTTAGTTACCGA	AY359580	

Tabela 2 (Continuação)

Genes de milho (<i>Zea mays</i>)	Siglas	Sequência (5'a 3')	Nº de Acesso do GenBank.	Referência
Receptor de etileno em milho (<i>Zea mays</i>) <i>B73</i>	<i>Zmetr2b</i>	GCTATGTATGTGTGAAATTTGAGATTAGGA AAGCTACAGCGGTCTATTGAGAAATTCT	AY359581	CHEN e GALLIE, 2010; GALLIE, 2004

4.11. Condições da qRT – PCR :

As concentrações dos iniciadores para amplificação de transcritos dos genes dos transportadores influxo de auxina e dos receptores de etileno foram determinadas neste estudo. As concentrações para os demais genes foram determinadas por Amaral, *et al* (artigo submetido). A curva padrão relativa foi realizada para cada gene alvo e comparada com o gene constitutivo (α – tubulina) por meio de diluição seriada do cDNA molde. Para este fim, o cDNA foi diluído 5 vezes partindo de uma quantidade inicial de 100 ng de cDNA de uma amostra de plântulas não inoculadas em triplicata, com o objetivo de determinar a eficiência das amplificações. As reações de amplificação das amostras foram realizadas em triplicata, em poços adjacentes de uma mesma placa, nas seguintes condições: 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15s e 60 °C por 1 min. Imediatamente após os ciclos, foi produzida uma curva de dissociação com aumento linear de 60 °C a 95 °C realizado no ABI PRISM™ 7500 detection system. A quantificação relativa dos transcritos dos genes β – actina (*Zmact*), auxina -1 (*Zmaux1*), giberelina 20 oxidase (*Zmga20ox4*), proteína quinase ativadora de mitose (*Zmmpk5*), as enzimas relacionadas ao burst oxidativo (*ZmrbohA*, *ZmrbohB*), e o do carreador efluxo de auxina (*Zmpin1a*) foi determinado em relação à α -tubulina (gene de referência) e foram calculados de acordo com Pfaffl (2001) com modificações propostas por Mcmaugh e Lyon (2003) (Figura 11). Os resultados de expressão relativa foram calculados em relação ao grupo das plântulas não inoculadas com 1 D.A.I. (1X), com aumento ou diminuição.

$$\text{Expressão Relativa} = \frac{E_{(alvo)}^{\Delta Ct_{Alvo}(\text{Controle-Infestado})}}{E_{(ref.)}^{\Delta Ct_{ref}(\text{Controle-Infestado})}}$$

Figura 11. Equação utilizada no cálculo da expressão relativa dos genes alvos de acordo com Pfaffl (2001) com modificações propostas por Mcmaugh e Lyon (2003) utilizando a α -tubulina como gene de referência. $E_{(alvo)}$ = Eficiência do gene Alvo, $E_{(ref.)}$ = Eficiência do gene de referência.

4.12. Análise Estatística:

Depois de realizada a análise das variâncias (ANOVA) dos dados, foi verificada a distribuição destes por meio do teste de Bartlett, que verifica a homogeneidade, e pelo teste de Shapiro-Wilk, que verifica se estes tem distribuição normal. Dependendo da distribuição apresentada se aplicou ou o t – teste ou o teste de Wilcoxon/Mann-Whitney para verificar a diferença entre as médias.

5. Resultados:

5.1. Parâmetros de Crescimento de plântulas de milho inoculadas com *Azospirillum brasilense* FP2:

5.1.1. Milho variedade *DKB240*:

Após a coleta das plântulas inoculadas e não inoculadas a 1, 4, 7 e 10 D.A.I., foram medidos a massa fresca e o comprimento da parte aérea e das raízes das plântulas e verificado o número de raízes laterais nas mesmas. Além disso, foram estocadas em freezer a – 80 °C amostras de raízes e de parte aérea das plântulas inoculadas e não inoculadas.

Não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos de plântulas inoculadas e não inoculadas em nenhuma das variáveis analisadas (Figuras 11 e 12). Por esta razão, se optou por não utilizar esta variedade para avaliar a expressão gênica nas plântulas.

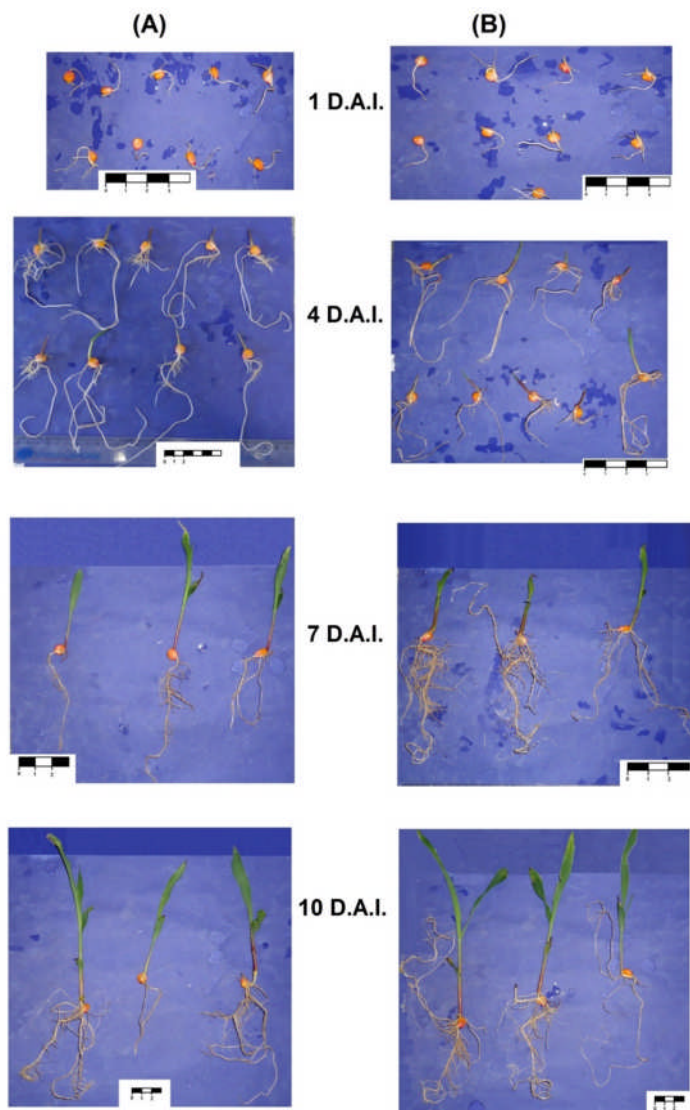


Figura 12. Plântulas de milho DKB240 não inoculadas (A) e inoculadas com *Azospirillum brasilense* FP2 (B) da 1ª repetição coletadas 1, 4, 7 e 10 dias após a inoculação (D.A.I.). Os espaços na escala correspondem a 1 cm.

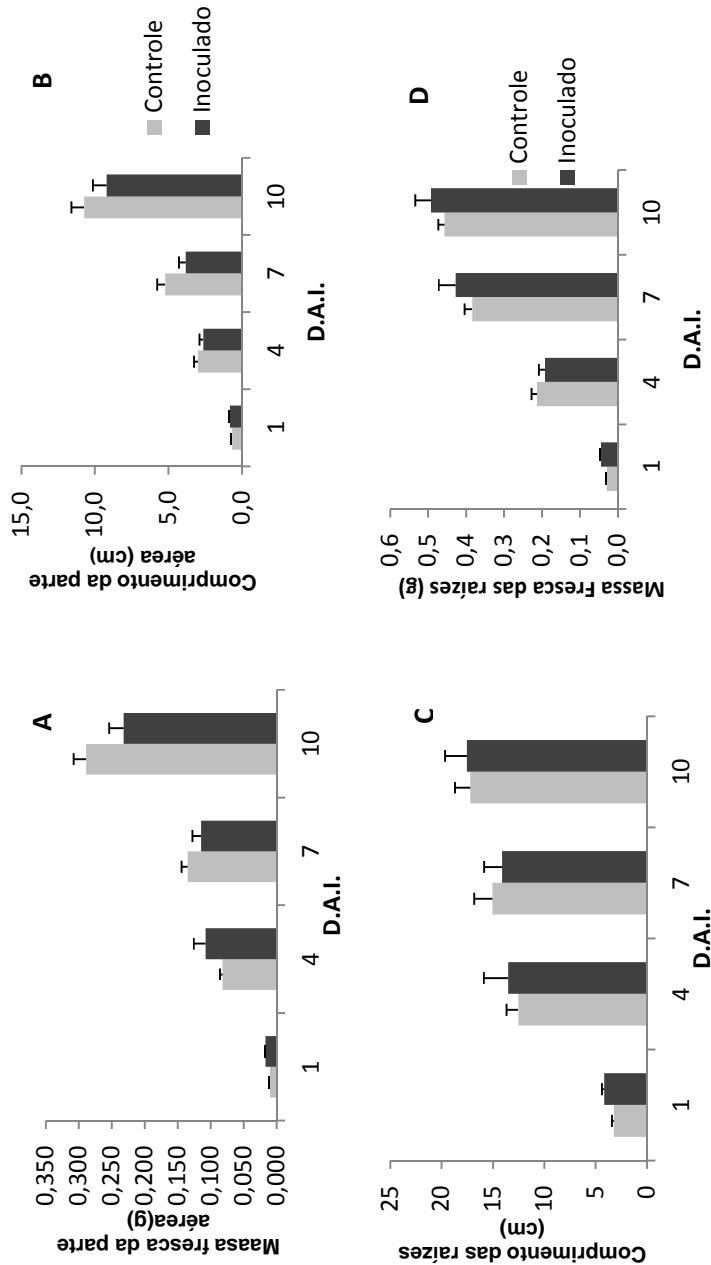


Figura 13. Crescimento de plântulas de milho (variedade DKB 240) em substrato estéril após inoculação com a bactéria *Azospirillum brasilense* FP2. Foram realizadas coletas com 1, 4 7 e 10 dias após a inoculação (D.A.I.). (A) Peso da parte aérea, (B) Comprimento da parte aérea, (C) Comprimento de raiz, e (D) peso da raiz. Valores são expressos como média \pm EP (n=27). Anova ($p<0,05$)

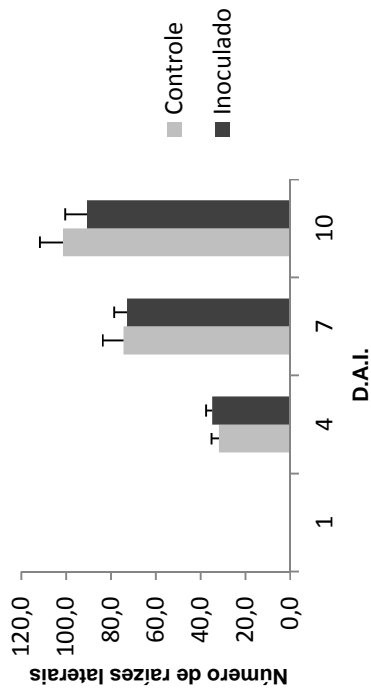


Figura 14. Número de raízes laterais de plântulas de milho (variedade DKB240) crescidas em areia estéril após inoculação com a bactéria *Azospirillum brasilense* FP2. Foram realizadas coletas com 1, 4 7 e 10 dias após a inoculação (D.A.I.). Valores são expressos como média \pm EP (n=27). Anova ($P<0,05$).

5.1.2. Milho variedade *Pioneer 30F53*:

Após a coleta das plântulas inoculadas e não inoculadas a 1, 4, 7 e 10 D.A.I., foram medidos a massa fresca e o comprimento da parte aérea e das raízes das plântulas e verificado o número de raízes laterais nas mesmas. Além disso, foram estocadas em freezer a -80°C amostras de raízes e de parte aérea das plântulas inoculadas e não inoculadas.

Assim, diferenças estatísticas foram observadas em 10 D.A.I. no comprimento da parte aérea. Nas demais variáveis analisadas não houve diferença estatística entre as plântulas inoculadas e não inoculadas (Figuras 14 e 15).

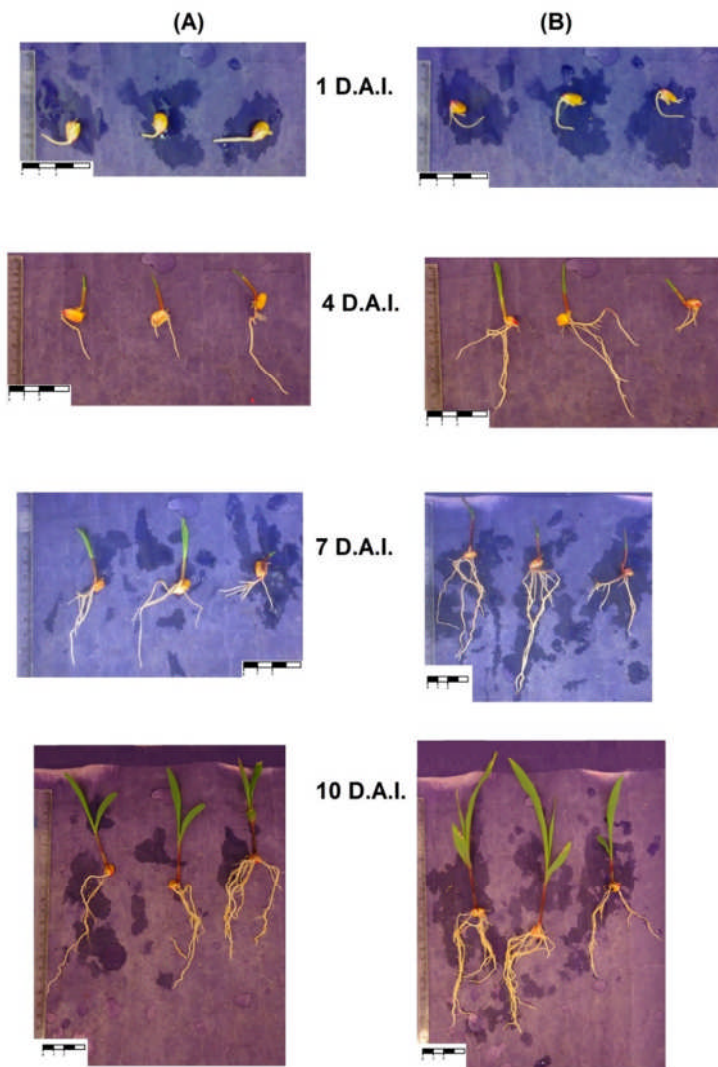


Figura 15. Plântulas de milho Pioneer 30F53 não inoculadas (A) e inoculadas com *Azospirillum brasilense* FP2 (B) da 3ª repetição coletadas com 1, 4, 7 e 10 dias após a inoculação (D.A.I.). Os espaços na escala correspondem a 1 cm.

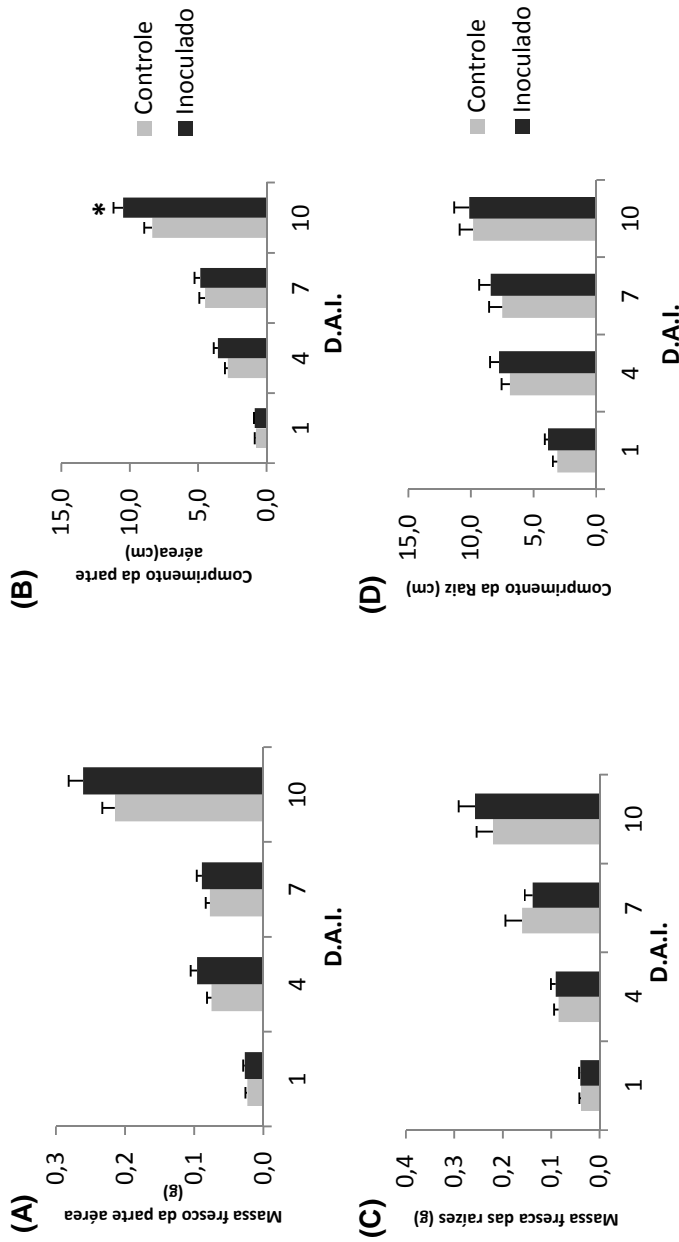


Figura 16. Crescimento de plântulas de milho (Pioneer variedade 30F53) em substrato estéril após inoculação com a bactéria *Azospirillum brasilense* FP2. Foram realizadas coletas com 1, 4 7 e 10 dias após a inoculação (D.A.I.). (A) Peso da parte aérea, (B) Comprimento da parte aérea, (C) Comprimento de raiz, e (D) peso da raiz. Valores são expressos como média \pm EP (n=27). Asterisco (*) indica diferenças estatísticas entre as médias dos grupos de plântulas de acordo com o teste t ($P < 0,05$).

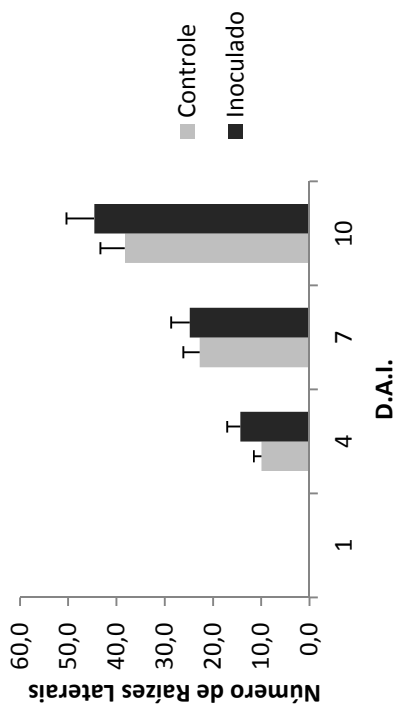


Figura 17. Número de raízes laterais de plântulas de milho (Pioneer variedade 30F53) crescidas em substrato estéril após inoculação com a bactéria *Azospirillum brasilense* FP2. Foram realizadas coletas com 1, 4 7 e 10 dias após a inoculação (D.A.I.). Valores são expressos como média \pm EP ($n=27$). Anova ($P<0,05$).

5.2. Quantificação de DNA de *Azospirillum brasilense* FP2 em plântulas de milho:

Apesar das variáveis de crescimento serem uma ferramenta eficaz na determinação dos efeitos da inoculação de plântulas de milho por *A. brasilense*, eles não são capazes de indicar quando a bactéria colonizou os tecidos da planta, onde se instalou, e qual a quantidade de bactéria presente nestes tecidos.

Assim, com o intuito de detectar a presença da bactéria e quantificá-la nas amostras de plântulas inoculadas, nesta etapa do trabalho foram utilizadas duas metodologias: uma para detectar – por PCR convencional – a presença de *A. brasilense* em plântulas de milho inoculadas com esta bactéria, e outra para quantificar – por qPCR – o DNA desta bactéria presente nas plântulas de milho.

5.2.1. Determinação da presença de *A. brasilense* em amostras de milho:

Com o intuito de determinar se a bactéria *A. brasilense* FP2 está presente em amostras de milho inoculado, foram sintetizados iniciadores para PCR convencional de acordo com Shime-Hattori (2011) para amplificar a sequência de DNA do gene *AznifA* (tabela 1). Estes iniciadores geraram produtos de PCR para este gene em três espécies de *Azospirillum*: em duas das três cepas testadas de *A. brasilense*, na cepa testada de *A. halopraeferens*, e na cepa de *A. rugosum* (SHIME-HATTORI et al., 2011).

Assim, a fim de verificar se estes iniciadores amplificariam também a sequência do gene *AznifA* da cepa de *A. brasilense* FP2, estes foram testados utilizando como alvo o DNA da bactéria isolado a partir de células de *A. brasilense* FP2 crescidas em meio NFbHP/lactato e usando *Herbaspirillum seropedicae* como controle negativo. Nesta reação de PCR

ambos os pares de iniciadores (*AznifA-A* e *AznifA-B*) geraram produtos na amplificação apenas das amostras de DNA de *A. brasiliense* FP2, o que indicou que estes pares de iniciadores apresentam resultado positivo para a cepa testada (Figura 16).

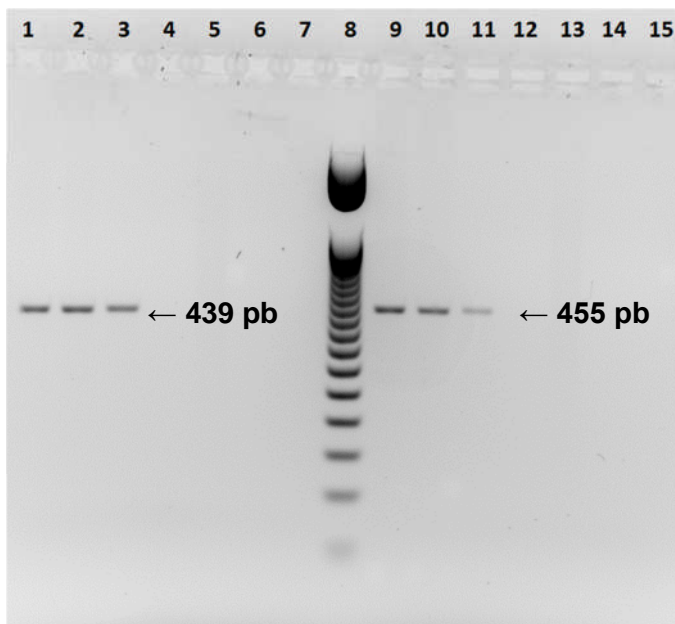


Figura 18. Detecção dos fragmentos com, respectivamente, 439 pb e 455 pb de *AznifA-A* (F)/ *AznifA-A* (R) e *AznifA-B* (F)/ *AznifA-B* (R). em duas amostras de *A. brasiliense* e em 2 amostras de *Herbaspirillum seropedicea*. Legenda: canaletas 1 e 9: *Azospirillum* amostra 1, canaletas 2 e 10: *Azospirillum* amostra 2, canaletas 3 e 11: *Azospirillum* amostra 2 Diluída (1:10), canaletas 4 e 12: *Herbaspirillum* amostra 1, canaletas 5 e 13: *Herbaspirillum* amostra 2, canaletas 6 e 14: *Herbaspirillum* amostra 2 Diluído (1:10), canaletas 7 e 15: Água, canaleta 8: Marcador Molecular (50 pb). As amostras de 1 a 7 foram amplificadas com os iniciadores *AznifA-A* (F)/ *AznifA-A* (R) e as amostras 9 a 15 com os iniciadores *AznifA-B* (F)/ *AznifA-B* (R).

Após este primeiro teste, foi realizada a extração do DNA total de raízes de plântulas de milho inoculadas e não inoculadas de duas variedades de milho (DKB240 e Pioneer 30F53). Para esta extração de DNA foram utilizadas raízes de plântulas inoculadas e não inoculadas 10 D.A.I. . Depois de extraído o DNA total presente nas amostras, este foi quantificado em Nanodrop e posteriormente foi realizada a PCR convencional com os dois pares de iniciadores. Como controles foram usados uma amostra de grão de milho e uma amostra de *A. brasilense*. Como resultado foi observado uma fraca amplificação para as amostras do grupo das plântulas inoculadas que foram amplificadas com os iniciadores *AznifA-A* (Dados não mostrados).

Com base neste resultado, decidiu-se aumentar de 35 para 45 o número de ciclos da PCR, pois se acreditava que esta fraca amplificação foi devida à pequena quantidade de DNA bacteriano presente na amostra em relação ao DNA da planta. Tal fato se mostrou verdadeiro, pois após nova amplificação em que somente se alterou o número de ciclos (45 ciclos), a banda correspondente às amostras de DNA de milho inoculado amplificado com o par de iniciadores *AznifA-A* ficaram visíveis. Não houve amplificação nas amostras de milho inoculado nas quais foram utilizados o par de iniciadores *AznifA-B* (figura 17). Assim, nas etapas seguintes do experimento, somente se usou o par de iniciadores *AznifA-A*.

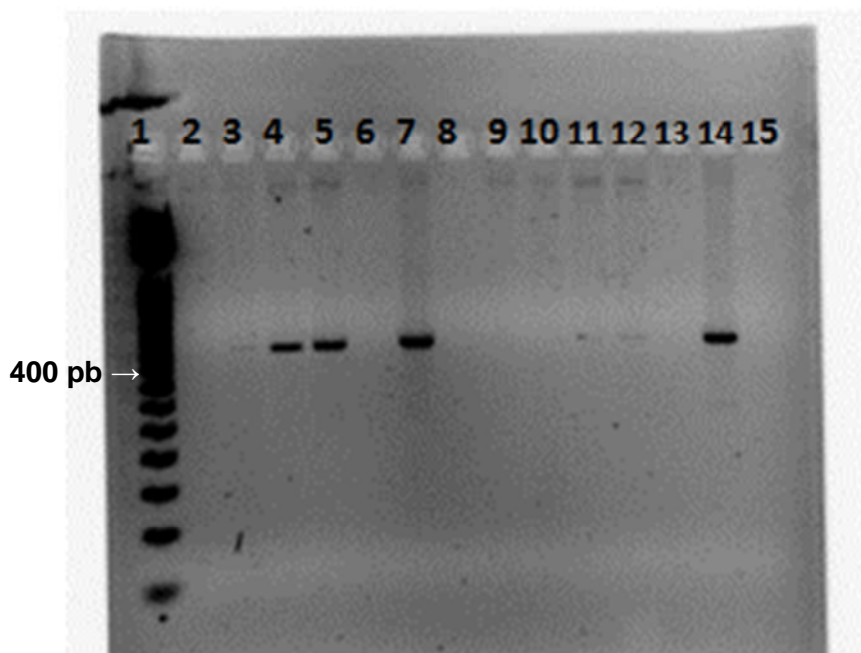


Figura 19. Detecção dos fragmentos com, respectivamente, 439 pb e 455 pb de AznifA- (F)/ AznifA-A (R) e AznifA-B (F)/ AznifA-B (R).
 Legenda: Canaleta 1 : Marcador Molecular (50 pb), Canaletas 2 e 9: plântulas não inoculadas 10 D.A.I. (DKB240), Canaletas 3 e 10 : plântulas não inoculadas 10 D.A.I. (Pioneer 30F53), Canaletas 4 e 11: plântulas inoculadas 10 D.A.I. (DKB240), Canaletas 5 e 12 : plântulas inoculadas 10 D.A.I. (Pioneer 30F53), Canaletas 6 e 13: Milho, Canaletas 7 e 14 : Azospirillum, canaletas 8 e 15: Água. Canaletas de 1 a 7: amostras amplificadas com iniciadores AznifA-A (F)/ AznifA-A (R), e as canaletas 9 a 15: amostras amplificadas com iniciadores AznifA-B (F)/ AznifA-B (R).

Como no teste com 45 ciclos houve amplificação somente nas reações onde havia milho inoculado, resolveu-se realizar a extração do DNA das amostras com 7 e 10 D.A.I. de milho Pioneer 30F53 e realizar a PCR convencional destas amostras para verificar a presença ou não de *A. brasilense* nestas amostras. Foram feitas 2 extrações por repetição biológica.

Como esperado, somente houve amplificação nas amostras de plântulas inoculadas (Figura 18).

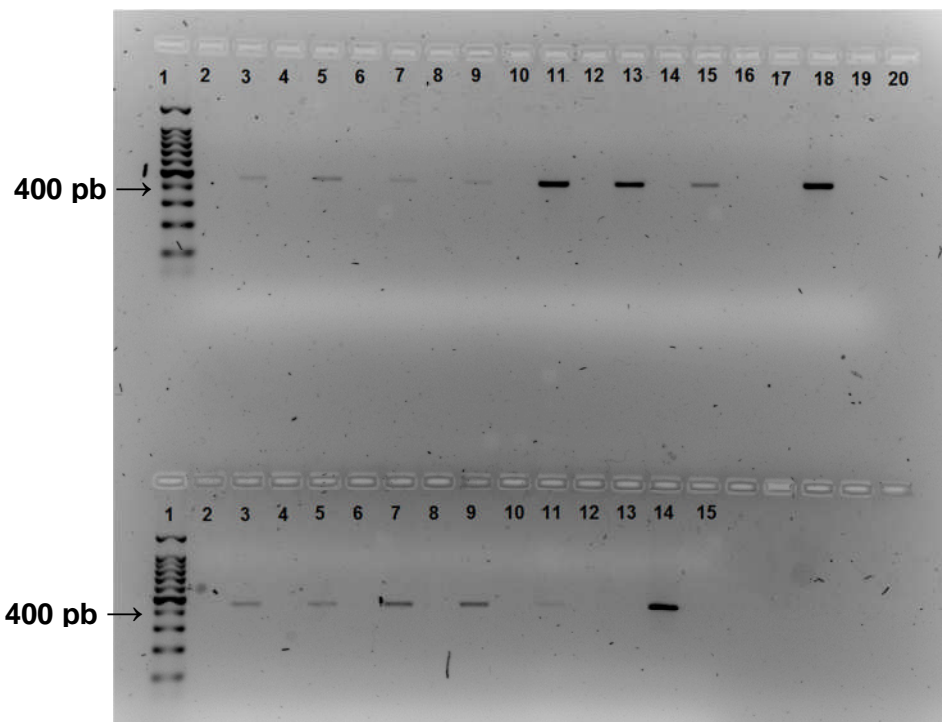


Figura 20. Detecção do fragmento com 439 pb após PCR usando os iniciadores AznifA-A (F) / AznifA-A (R). Legenda Parte Superior : 1 : Marcador Molecular (100 pb), 2,4,6,8, 10 e 12 : plântulas não inoculadas 7 D.A.I. (Pioneer 30F53), 3,5,7,9,11 e 13 : plântulas inoculadas 7 D.A.I. (Pioneer 30F53), 14 : plântulas não inoculadas 10 D.A.I. (Pioneer 30F53), 15 : plântulas inoculadas 10 D.A.I. (Pioneer 30F53), 16 e 17: Água, 18 : Azospirillum, 19: Milho. Legenda Parte Inferior : 1 : Marcador Molecular (100 pb), 2,4,6,8, 10 : plântulas não inoculadas 10 D.A.I. (Pioneer 30F53), 3,5,7,9,11 : plântulas inoculadas 10 D.A.I. (Pioneer 30F53), 12 e 13: Água, 14 : Azospirillum, 15: Milho.

Para confirmar que as amostras de DNA extraídas de raízes de milho contêm DNA amplificável, se realizou uma reação de PCR utilizando os iniciadores para o gene que codifica

a proteína de milho zeína (zeo). Como esperado, houve amplificação em todas as amostras de milho (plântulas inoculadas e não inoculadas, e DNA extraído de grãos de milho) e não houve amplificação nas amostras de DNA extraído de *A. brasilense* (figura 19).

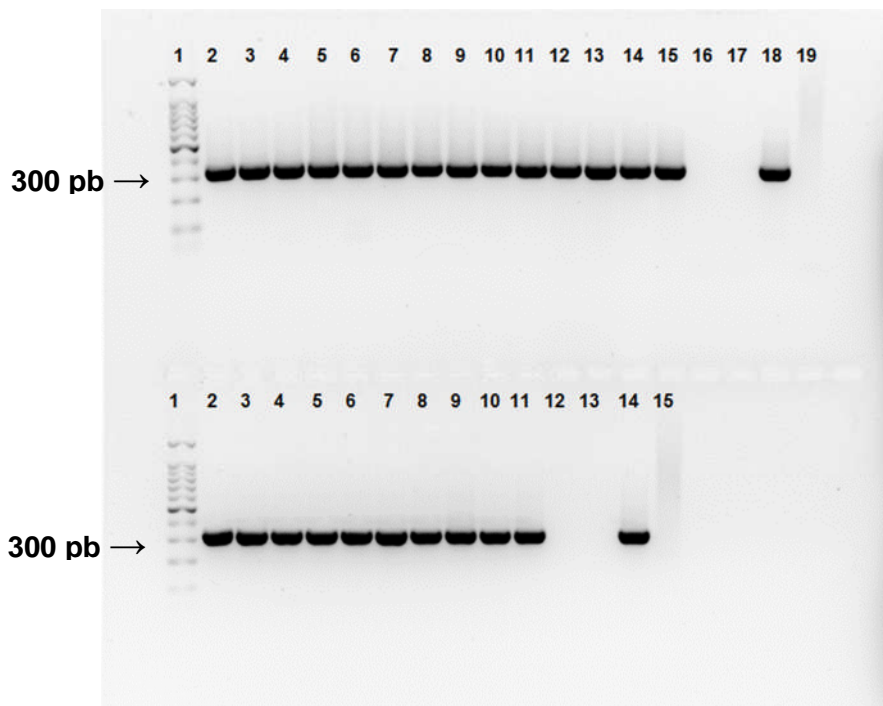


Figura 21. Detecção do fragmento com 329 pb do gene que codifica a proteína Zeína de milho, após PCR usando os iniciadores ZEO1 (F) / ZEO2 (R). Legenda Parte Superior : 1 : Marcador Molecular (100 pb), 2,4,6,8, 10 e 12 : plântulas não inoculadas 7 D.A.I. (Pioneer 30F53), 3,5,7,9,11 e 13 : plântulas inoculadas 7 D.A.I. (Pioneer 30F53), 14 : plântulas não inoculadas 10 D.A.I. (Pioneer 30F53), 15: plântulas inoculadas 10 D.A.I. (Pioneer 30F53), 16 e 17: Água, 18: Milho, 19: Azospirillum. Legenda Parte Inferior : 1 : Marcador Molecular (100 pb), 2,4,6,8, 10 : plântulas não inoculadas 10 D.A.I. (Pioneer 30F53), 3,5,7,9,11 : plântulas inoculadas 10 D.A.I. (Pioneer 30F53), 12 e 13: Água, 14 : Milho, 15: Azospirillum.

Como os testes com as amostras de raiz de 7 e 10 D.A.I. de milho Pioneer 30F53 foram bem sucedidos, se realizou a extração das demais amostras de raízes de milho (1 e 4 D.A.I.) e de todas as amostras de folha de milho. Foi possível detectar nas amostras de raiz a presença de *A. brasilense* nas plântulas inoculadas 4, 7 e 10 D.A.I. . Foi possível também detectar a presença da bactéria em uma das repetições do grupo das plântulas inoculadas 1 D.A.I. (Figura 20). Não se detectou a presença de bactéria na parte aérea das plântulas inoculadas em nenhum dos tempos de coleta (Figura 21) e nem nas amostras de raiz e de parte aérea das plântulas não inoculadas (Figuras 20 e 21).

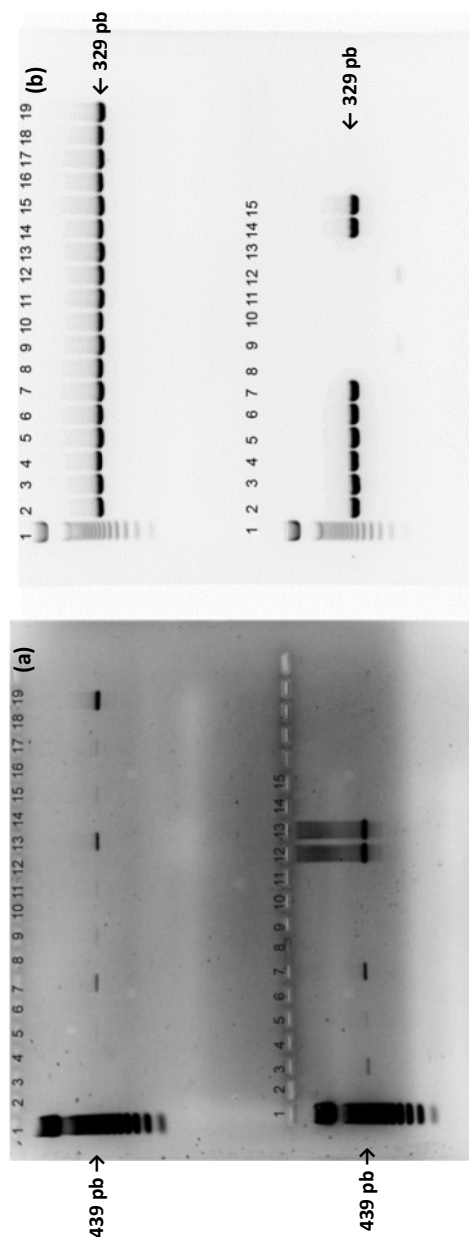


Figura 22. (a) Detecção do fragmento com 439 pb do gene *nifA* de *A. brasilense* em raiz de milho Pioneer 30F53 após PCR usando iniciadores AznifA-A (F) / AznifA-A (R). **(b)** Detecção do fragmento de 329 pb do gene que codifica a proteína Zeina em raiz de milho Pioneer 30F53 após PCR usando iniciadores ZEO1(F) e ZEO2(R). **Legenda Parte Superior** : 1 : Marcador Molecular (50 pb), 2,4 e 6 : plântulas não inoculadas 1 D.A.I (1^a, 2^a e 3^a repetições, respectivamente); 3,5 e 7: plântulas inoculadas 1 D.A.I (1^a, 2^a e 3^a repetições, respectivamente); 8,10 e 12 : plântulas não inoculadas 4 D.A.I (1^a, 2^a e 3^a repetições, respectivamente); 9,11 e 13: plântulas inoculadas 4 D.A.I (1^a, 2^a e 3^a repetições, respectivamente); 14,16 e 18: plântulas não inoculadas 7 D.A.I (1^a, 2^a e 3^a repetições, respectivamente); 15,17 e 19 : plântulas inoculadas 7 D.A.I (1^a, 2^a e 3^a repetições, respectivamente); **Legenda Parte Inferior** : 1 : Marcador Molecular (50 pb), 2,4 e 6 : plântulas não inoculadas 10 D.A.I. (1^a, 2^a e 3^a repetições, respectivamente); 3,5 e 7 : plântulas inoculadas 10 D.A.I. (1^a, 2^a e 3^a repetições, respectivamente); 8,9,10 e 11: Água, 12 e 13 : *Azospirillum brasilense*, 14 e 15: Milho.

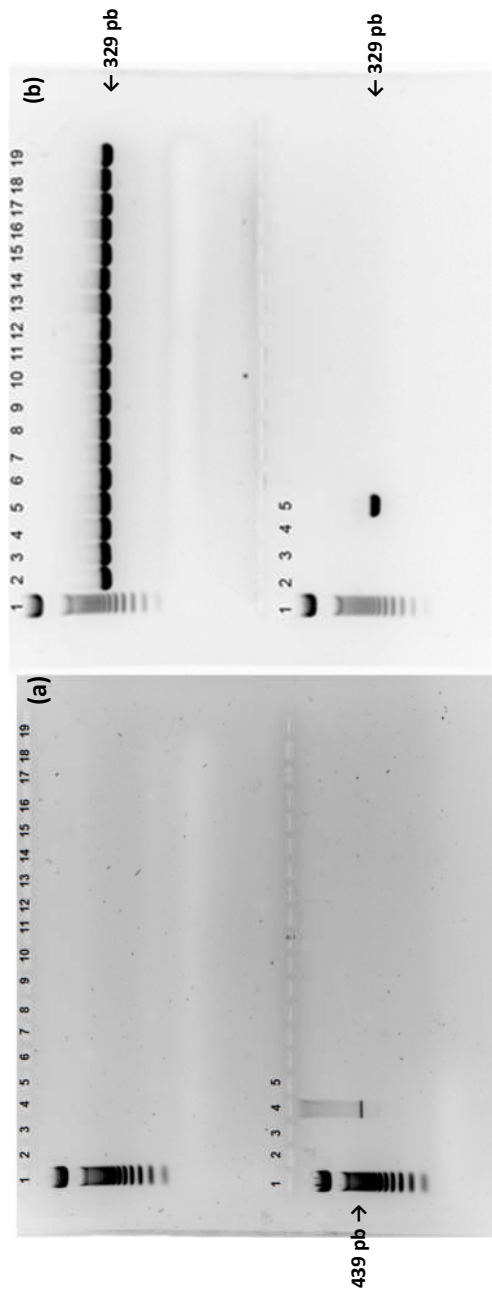


Figura 23. (a) Detecção do fragmento com 439 pb do gene *nifA* de *A. brasilense* em folha de milho Pioneer 30F53 após PCR usando iniciadores AznifA-A (F) / AznifA-A (R) -. **(b)** Detecção do fragmento de 329 pb do gene que codifica a proteína Zeína - ZEO1(F) e ZEO2(R) - em folha de milho Pioneer 30F53. **Legenda Parte Superior** : 1 : Marcador Molecular (50 pb), 2,4 e 6 : plântulas não inoculadas 4 D.A.I (1^a, 2^a e 3^a repetições, respectivamente); 3,5 e 7: plântulas inoculadas 4 D.A.I (1^a, 2^a e 3^a repetições, respectivamente); 8,10 e 12 : plântulas não inoculadas 7 D.A.I (1^a, 2^a e 3^a repetições, respectivamente); 9,11 e 13: plântulas inoculadas 7 D.A.I (1^a, 2^a e 3^a repetições, respectivamente); 14,16 e 18: plântulas não inoculadas 10 D.A.I. (1^a, 2^a e 3^a repetições, respectivamente); 15,17 e 19 : plântulas inoculadas 10 D.A.I. (1^a, 2^a e 3^a repetições, respectivamente); **Legenda Parte Inferior** : 1 : Marcador Molecular (50 pb), 2,3 : Água; 4 : *Azospirillum brasilense*, 5: Milho.

Tabela 3. Resumo do experimento de detecção de *Azospirillum brasilense* FP2 em amostras de plântulas inoculadas e não inoculadas por meio da amplificação de um fragmento da sequência do gene da bactéria *AznifA*. (+) detecção de produto da amplificação do fragmento de *AznifA* (detecção positiva de *A. brasilense* FP2), (-) não detecção de produto da amplificação do fragmento de *AznifA* (não detecção de *A. brasilense* FP2).

D.A.I.	Repetição	Plântulas Inoculadas	Não	Plântulas Inoculadas	
		Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea
1	1 ^a	-	-	-	-
	2 ^a	-	-	-	-
	3 ^a	-	-	+	-
4	1 ^a	-	-	+	-
	2 ^a	-	-	+	-
	3 ^a	-	-	+	-
7	1 ^a	-	-	+	-
	2 ^a	-	-	+	-
	3 ^a	-	-	+	-
10	1 ^a	-	-	+	-
	2 ^a	-	-	+	-
	3 ^a	-	-	+	-

5.2.2. Quantificação de DNA bacteriano em amostras de milho:

Após determinar a presença de *A. brasilense* FP2 em amostras de raízes de plântulas inoculadas com esta bactéria, foram desenhados dois pares de iniciadores para se realizar a quantificação desta bactéria por qPCR. Esses iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa Primer Express® v1.0 (Applied Biosystems) para gerar dois produtos de PCR, um com 180 pb e outro com 96 pb. Ambos os produtos são correspondentes a um fragmento do gene *AznifA*. Ao se desenhar estes iniciadores se buscou um região compreendida dentro do produto de PCR convencional gerado pela amplificação da reação com os iniciadores *AznifA-A* (Anexo I).

Depois de desenhados e sintetizados, estes iniciadores foram testados por meio de uma PCR convencional com as mesmas condições da qPCR. Nesta reação se utilizou amostras inoculadas e não inoculadas de milho Pioneer 30F53 4 D.A.I.. Neste teste, só houve amplificação nas amostras de milho inoculado quando utilizado o par de iniciadores *AznifA* – *F12*, de 96 pb (Dados não mostrados). Assim, se optou por este par de iniciadores para a realização da qPCR.

Após este teste, foi realizada a titulação dos iniciadores para qPCR e o posterior cálculo das eficiências para 3 extrações independentes de DNA bacteriano. A concentração de iniciadores que apresentou melhor resultado foi a obtida com a concentração de 600 nmol.L⁻¹, para ambos os iniciadores (Anexo III). Já as eficiências ficaram entre 85 e 91% (Figura 23).

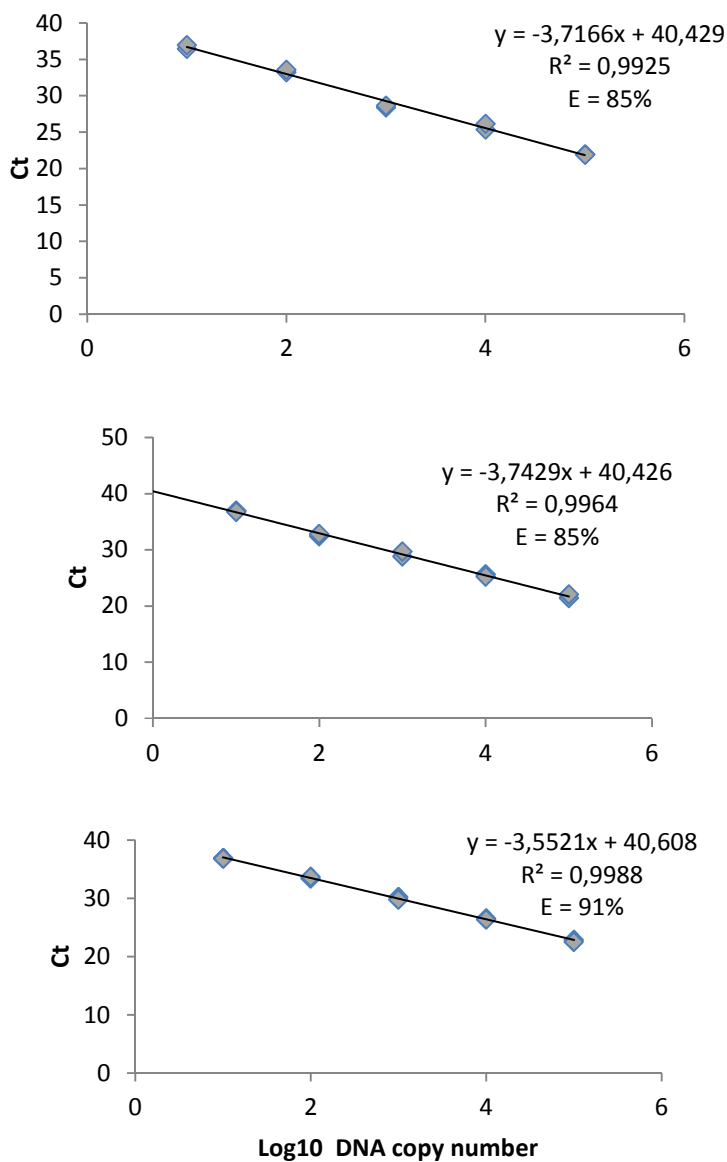


Figura 24. Curvas de Eficiência de qPCR usando como DNA molde 3 extrações independentes de DNA de *A. brasiliense*.

Feito isso, se realizou duas qPCR para determinar a quantidade de DNA bacteriano presente nos materiais vegetais em cada tempo de coleta (Figura 25). Assim, foi possível verificar que houve um crescimento no número de cópias de 1 a 4 D.A.I. de aproximadamente 4.000 cópias a mais de um tempo para o outro. Com 7 D.A.I. houve um aumento no número de cópias em torno de 3,5 vezes em relação à amostras de 4 D.A.I. . Por outro lado, com 10 D.A.I. houve uma diminuição no número de cópias de DNA bacteriano de aproximadamente 3,5 vezes em relação ao número de cópias verificado com 7 D.A.I., este número de cópias ficou próximo, mas ainda acima, do registrado com 1 D.A.I. . A quantidade de DNA bacteriano por reação foi determinada com base nas curvas padrões obtidas em paralelo durante cada uma das placas de qPCR com amostras em diluição seriada de DNA bacteriano (Figura 26).

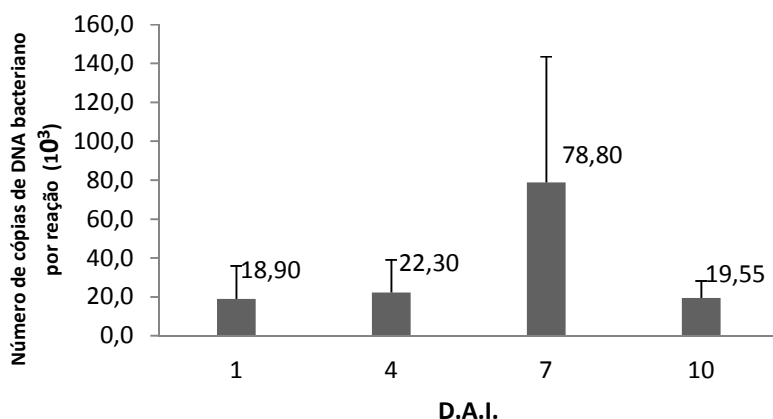


Figura 25. Número de cópias de DNA de *Azospirillum brasilense* FP2 por reação (50 ng de DNA total). Valores são expressos como Média \pm EP (n=3).

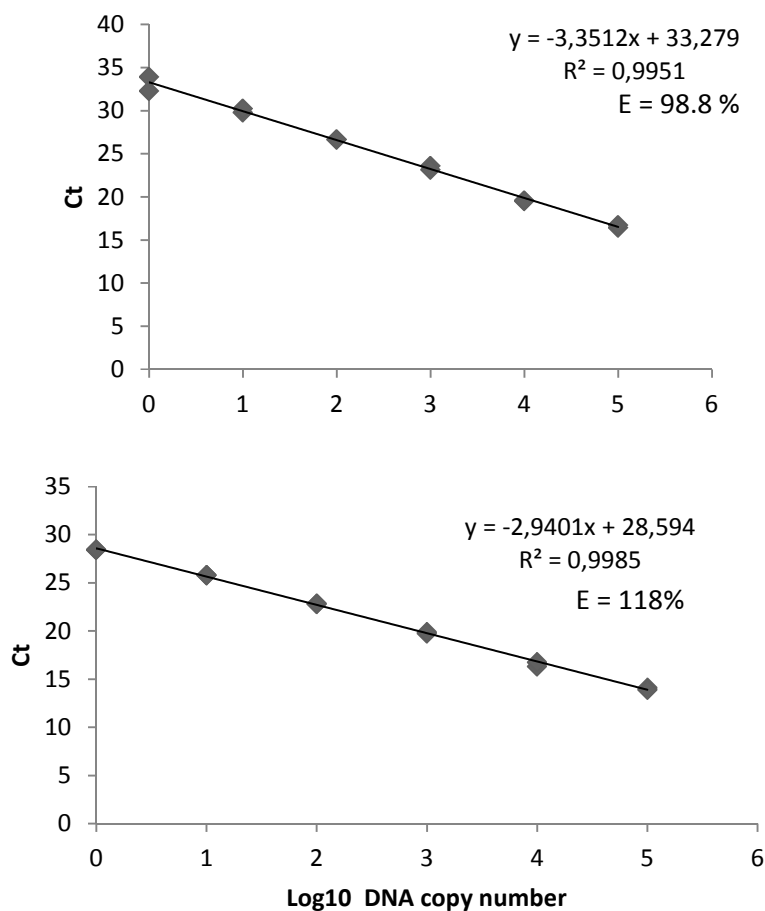


Figura 26. Curvas de Eficiência de qPCR usando como DNA molde DNA de *Azospirillum brasilense* FP2 em diluição seriada. Curvas foram utilizadas para quantificar DNA bacteriano presente em amostras de raiz inoculada.

5.3. Expressão Gênica:

Realizou-se a extração do RNA total de amostras de raiz e parte aérea de plântulas inoculadas e não inoculadas com *A. brasilense* FP2. Após esta extração, este RNA extraído foi usado como molde para a síntese do cDNA, que foi utilizado nos experimentos de expressão relativa.

Assim, inicialmente, foi realizada a titulação dos iniciadores para amplificação de fragmentos dos transcritos utilizados neste estudo, exceto para os iniciadores para amplificação dos transcritos dos genes das enzimas envolvidas no *burst* oxidativo (*ZmrbohA* e *ZmrbohB*) e do gene da cadeia transdutora de sinal (*Zmmpk5*) que já haviam sido previamente titulados por Amaral *et al.* (artigo submetido)(tabela 3). Nesta etapa não se conseguiu titular os iniciadores para amplificação dos transcritos do gene dos receptores de etileno (*Zmers1a*, *Zmetr2a*, *Zmetr2b*) e um dos pares de iniciadores para amplificar o transcrito do gene do transportador efluxo de auxina (*Zmpin1c*).

Feito isso, se determinou a eficiência das amplificações dos transcritos, à exceção das eficiências de amplificação dos transcritos dos genes das enzimas envolvidas no *burst* oxidativo (*ZmrbohA* e *ZmrbohB*) e do gene da cadeia transdutora de sinal (*Zmmpk5*) que já haviam sido previamente determinados por Amaral *et al.* (artigo submetido) (tabela 4 e 5). Nesta etapa não foi possível calcular a eficiência da reação de amplificação dos genes do receptor de etileno (*Zmers1b*) e do transportador efluxo de auxina *Zmpin1a* e *Zmpin1b* para amostras de raiz, e *Zmpin1b*, para amostras de parte aérea (dados não mostrados).

Assim, após isso se realizou as reações de amplificação das amostras. Foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos de plântulas inoculadas e não inoculadas em pelo menos um dos tempos de coleta na expressão da maioria dos genes analisados (Figuras 26 a 29). Observou-se que a expressão dos genes envolvidos no *burst* oxidativo (Figura 26) apresentou diferenças estatísticas em amostras de raízes de milho 1, 4 e 7 D.A.I.. O gene *ZmrbohA* (*Z. mays* respiratory burst oxidase homologue A) apresentou maior expressão nas amostras de

plântulas inoculadas com 1 e 4 D.A.I. (aproximadamente 7,1X e 12,8X, respectivamente, em relação às plântulas não inoculadas). Já para a expressão do gene *ZmrbohB* (*Z. mays* respiratory burst oxidase homologues B) houve aumento no nível de transcritos nas amostras de plântulas inoculadas em relação às não inoculadas em 4 e 7 D.A.I. (aproximadamente 12,2X e 26X, respectivamente). Para os demais tempos de coleta, não houve diferenças estatísticas entre os grupos analisados (Figura 26). Com relação ao gene *Zmmpk5* (*Zea mays* mitogen-activated protein kinase 5), pertencente à cadeia transdutora de sinal, foram observadas diferenças estatísticas entre as plântulas inoculadas e não inoculadas para todos os tempos de coleta em amostras de raiz de milho (Figura 26). Com 1,4 e 7 D.A.I. houve uma maior expressão no grupo de plântulas inoculadas (aproximadamente 9,5X, 6,6X e 10,4X respectivamente). Por outro lado, com 10 D.A.I. houve maior expressão do grupo de plântulas não inoculadas (aproximadamente 21X) em relação às plântulas inoculadas.

Quanto aos genes envolvidos no transporte efluxo (*Zmpin1a*) e influxo (*Zmaux1*) de auxinas, foi possível detectar diferenças estatísticas entre as plântulas inoculadas e não inoculadas em alguns dos tempos de coleta em amostras de raiz e de parte aérea. Em amostras de raiz, foi observada uma maior expressão do gene *Zmaux1* nas plântulas inoculadas em relação às não inoculadas para 1, 4 e 7 D.A.I. (7,4X, 11,9X e 30,6X, respectivamente), e, para amostras de parte aérea, foi observada uma maior expressão deste gene nas plântulas inoculadas em relação às não inoculadas para 7 D.A.I. (50X). Nos demais tempos de coleta, para ambas as amostras, não houve diferenças estatísticas entre os grupos analisados (Figura 27). Para o gene *Zmpin1a* foi detectada diferenças estatísticas entre as plântulas inoculadas e não inoculadas nas amostras de parte aérea com 7 e 10 D.A.I. . Em 7 D.A.I. houve maior expressão em plântulas inoculadas (17,6X) quando comparado com as não inoculadas, e, por outro lado, com 10 D.A.I. , houve maior expressão nas plântulas não inoculadas (5,8X) quando comparado com as inoculadas (Figura 27).

Para os genes envolvidos na síntese de giberelinas (*Zmko1* e *Zmga20ox4*), foram observadas diferenças estatísticas

entre as plântulas inoculadas e não inoculadas em todos os tempos de coleta nas amostras de raiz e em 2 tempos de coleta em amostras de parte aérea para o gene *Zmko1*, e para o gene *Zmga20ox4* foi observada diferença estatística somente na amostra de parte aérea com 7 D.A.I. . Para os demais tempos de coleta não foram observadas diferenças estatísticas entre as plântulas inoculadas e não inoculadas tanto em amostras de parte aérea, quanto para amostras de raiz na expressão de ambos os genes. Para o gene *Zmko1* foi observada diferenças de expressão entre os grupos analisados em todos os tempos nas amostras de raiz. Com 1, 4 e 7 D.A.I. houve uma maior expressão nas plântulas inoculadas (aproximadamente 9,1X, 2,2X e 1,4X, respectivamente) em relação às não inoculadas, e, com 10 D.A.I., houve maior expressão em plântulas não inoculadas (4,8X) em comparação com as inoculadas (Figura 28). Para este gene, nas amostras de parte aérea, houve uma maior expressão nas plântulas inoculadas quando comparado com as não inoculadas nas amostras de 4 e 7 D.A.I. (aproximadamente 1,3X e 0,6X, respectivamente). Com relação à expressão do gene *Zmga20ox4* houve diferença entre a expressão nas plântulas inoculadas e não inoculadas somente na amostra de parte aérea com 7 D.A.I., em que foi observado uma maior expressão nas plântulas inoculadas (0,6X) quando comparada com as plântulas não inoculadas.

Por fim, foram observadas diferenças estatísticas entre as plântulas inoculadas e não inoculadas para a expressão do gene *Zmact* nas amostras de raiz e de parte aérea. Em raiz, com 1 D.A.I. (3,6X) houve uma maior expressão do gene nas plântulas inoculadas em relação às não inoculadas. Nas amostras de parte aérea houve uma maior expressão nas plântulas inoculadas (1,2X) em relação às não inoculadas em 7 D.A.I. . Nos demais tempos para amostras de parte aérea não foi possível observar diferenças estatísticas entre os grupos analisados.

Tabela 4. dos iniciadores utilizados.

Genes de milho (<i>Zea mays</i>)	Iniciadores (5' a 3')	Concentração (nmol.L ⁻¹)	Tamanho do Fragmento (bp)	Nº de Acesso no GenBank	Referência
<i>Zmact</i>	GCGCACCATCCAGTTCGT	300	60	X73980	SUI <i>et al.</i> , (2008)
	CTGGTAGTTGATTCCGCACCTTG	300			
<i>Zmtub</i>	GCAGCATGAAGGTTAAAGTGATTG	300	61	NM_0011 55179.1	MELLO <i>et al.</i> (2012)
	GCCACCGATCCAGACACTGT	300			
<i>Zmaux1</i>	CGAAACGCACCCCTGCATT	300	41	NM_0011 58094.1	Amaral, <i>et al</i> *
	CCCGCTTTTACAGTGGAAGAT	500			
<i>Zmga20ox4</i>	GAGAGGTTCTCCATGCCCTA	500	122	NM_0011 56071	SONG <i>et al.</i> (2011)
	AAGAAAGTCGCCCCAGTTGTA	100			
<i>Zmko 1</i>	CAATCTGTACGGGTGCAACA	300	300	BT042205	SONG <i>et al.</i> (2011)
	CCTCTAGGTGCGAGGTACACAT	300			
<i>Zmmpk5**</i>	TCTGCTCGGCGGTCAACT	500	67	AB016802	ZHANG (2010)
	AAGCGTTGGCGATCTTCTT	100			

Genes de milho (<i>Zea mays</i>)	Iniciadores (5' a 3')	Concentração (nmol.L ⁻¹)	Tamanho do Fragmento (bp)	Nº de Acesso no GenBank	Referência
<i>ZmrbahA</i> **	CACACGTGACCTGCGACTTC	100	68	DQ85528 4	ZHANG <i>et al.</i> (2010)
	CCCCAAGGTGGCCATGA	300			
<i>ZmrbahB</i> **	GGCCAGTACTTCGGTGAAACA	500	74	EU807966	ZHANG <i>et al.</i> (2010)
	ATTACACCAGTGATGCCCTTCCA	300			
<i>Zmpin1a</i>	GCAGGGCAAGGCGAACAAGTACGGCCAG	100	72	DQ83623 9	FORESTAN <i>et al.</i> (2010)
	GGCGACGGCCATGCGGACCTCCTTGAC	500			

* artigo submetido.

** Concentrações determinadas por Amaral, *et al* (artigo submetido).

Tabela 5. Valores das eficiências e de R^2 da amplificação por qRT-PCR para as amostras de parte aérea da planta.

Gene	Sigla	Eficiência %	R^2
<i>alfa tubulina</i>	<i>Zmtub</i>	132,0	0,9364
<i>beta actina</i>	<i>Zmact</i>	101,0	0,9655
<i>Zea mays auxin transporter-like protein 1</i>	<i>Zmaux1</i>	141,0	0,9769
<i>Giberelina 20 oxidase 4</i>	<i>Zmgaox4</i>	109,0	0,9601
<i>ent-kaurene oxidase</i>	<i>Zmko1</i>	91,0	0,7925
<i>Provável transportador efluxo de auxinas em milho (Zea mays) (PIN1a)</i>	<i>Zmpin1a</i>	156,0	0,7971

Tabela 6. Valores das eficiências e de R² dos iniciadores utilizados para as amostras de raiz.

Gene	Sigla	Eficiencia %	R²
<i>alfa tubulina</i>	<i>Zmtub</i>	110,7	0,9803
<i>beta actina</i>	<i>Zmact</i>	86,7	0,9709
<i>Zea mays auxin transporter-like protein 1</i>	<i>Zmaux1</i>	97,6	0,9299
<i>Giberelina 20 oxidase 4</i>	<i>Zmgaox4</i>	78,7	0,8406
<i>ent-kaurene oxidase</i>	<i>Zmko1</i>	73,0	0,9115
<i>Mitogen-activated protein kinase 5*</i>	<i>Zmmpk5</i>	90	0,995
<i>Respiratory burst oxidase homologues A *</i>	<i>ZmrbohA</i>	95	0,996
<i>Respiratory burst oxidase homologues B *</i>	<i>ZmrbohB</i>	108	0,95

* Valores calculados por Amaral, et al (artigo submetido).

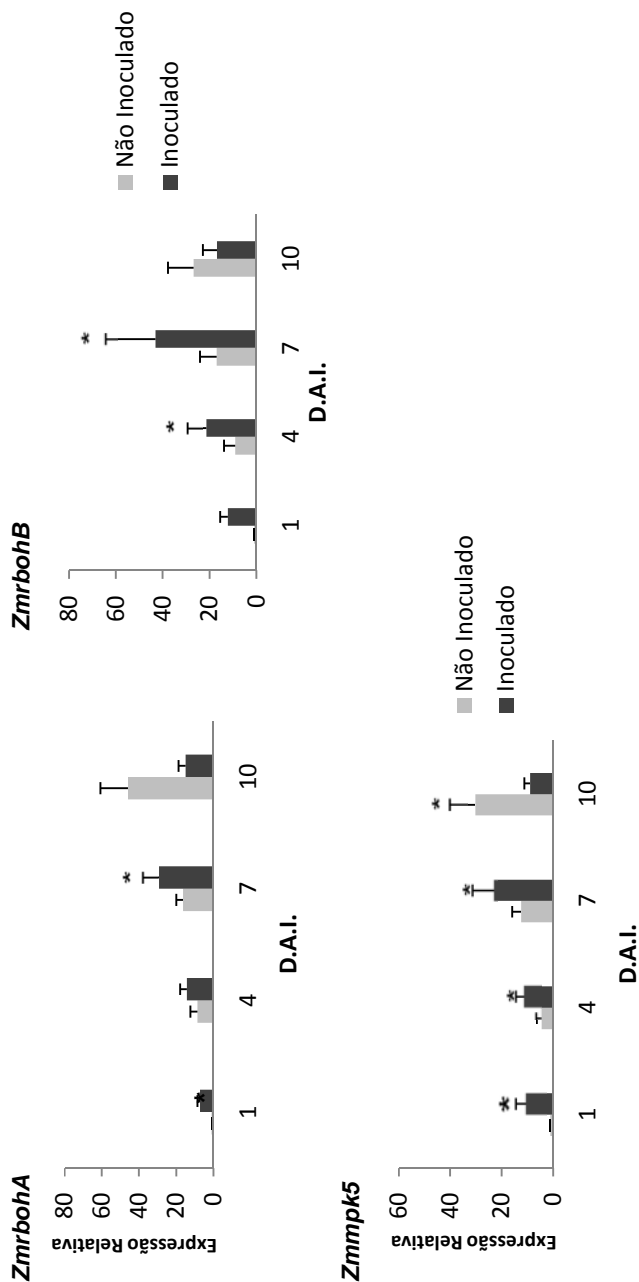


Figura 27. Expressão relativa dos genes *ZmrbohA*, *ZmrbohB* e *Zmmpk5* em raízes de plântulas de milho Pioneer 30F53 crescidas em substrato estéril e inoculadas com *Azospirillum brasilense* FP2. Amostras plântulas inoculadas e não inoculadas foram coletadas 1, 4, 7 e 10 dias após a inoculação (D.A.I.). Quantidade relativa de transcritos foi calculada por qRT – PCR usando o método de Pfaffl (2001) modificado por Mcmaugh e Lyon (2003), e α – tubulina como gene de referência. Dados apresentados como Média \pm EP (n = 9). Asterisco (*) indica diferenças estatísticas de acordo com Wilcoxon/Mann-Whitney ($p < 0,05$).

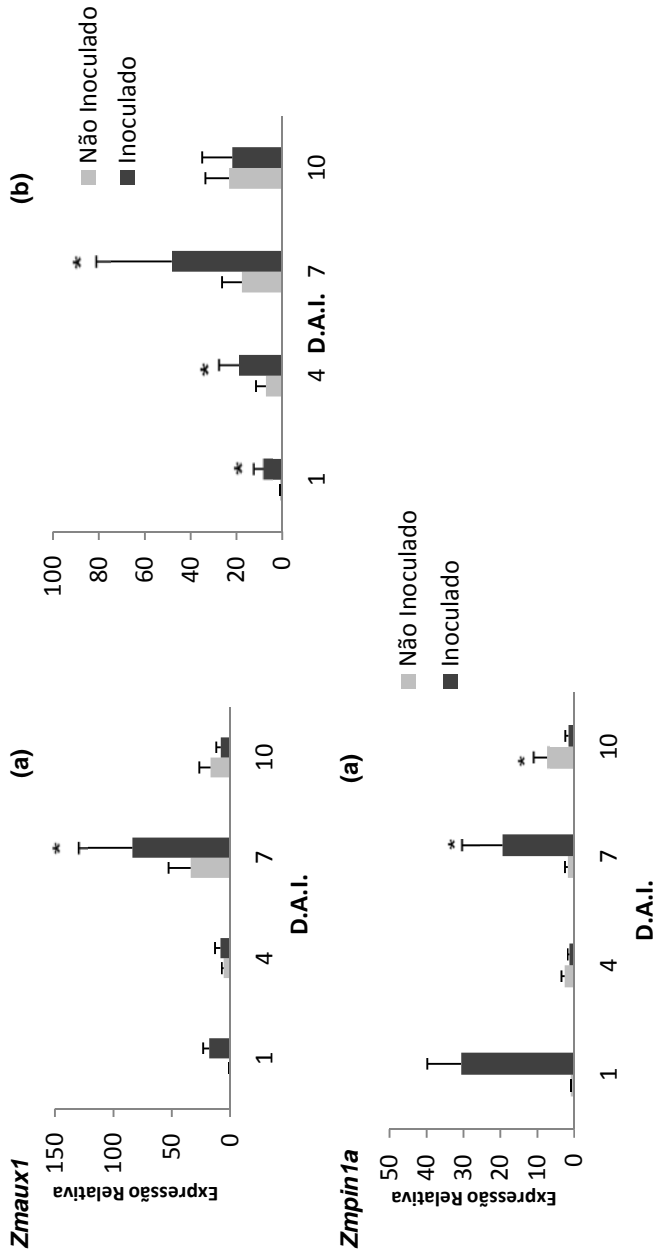


Figura 28. Expressão relativa do gene *Zmpin1a* em parte aérea e de *Zmaux1* em parte aérea (a) e em raízes (b) de plântulas de milho Pioneer 30F53 crescidas em substrato estéril e inoculadas com *Azospirillum brasilense* FP2. Amostras de plântulas inoculadas e não inoculadas foram coletadas 1, 4, 7 e 10 dias após a inoculação (D.A.I.). Quantidade relativa de transcritos foi calculada por qRT – PCR usando o método de Pfaffi (2001) modificado por Mcmaugh e Lyon (2003), e α – tubulina como gene de referência. Dados apresentados como Média \pm EP (n = 9). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas de acordo com Wilcoxon/Mann-Whitney ($p < 0,05$).

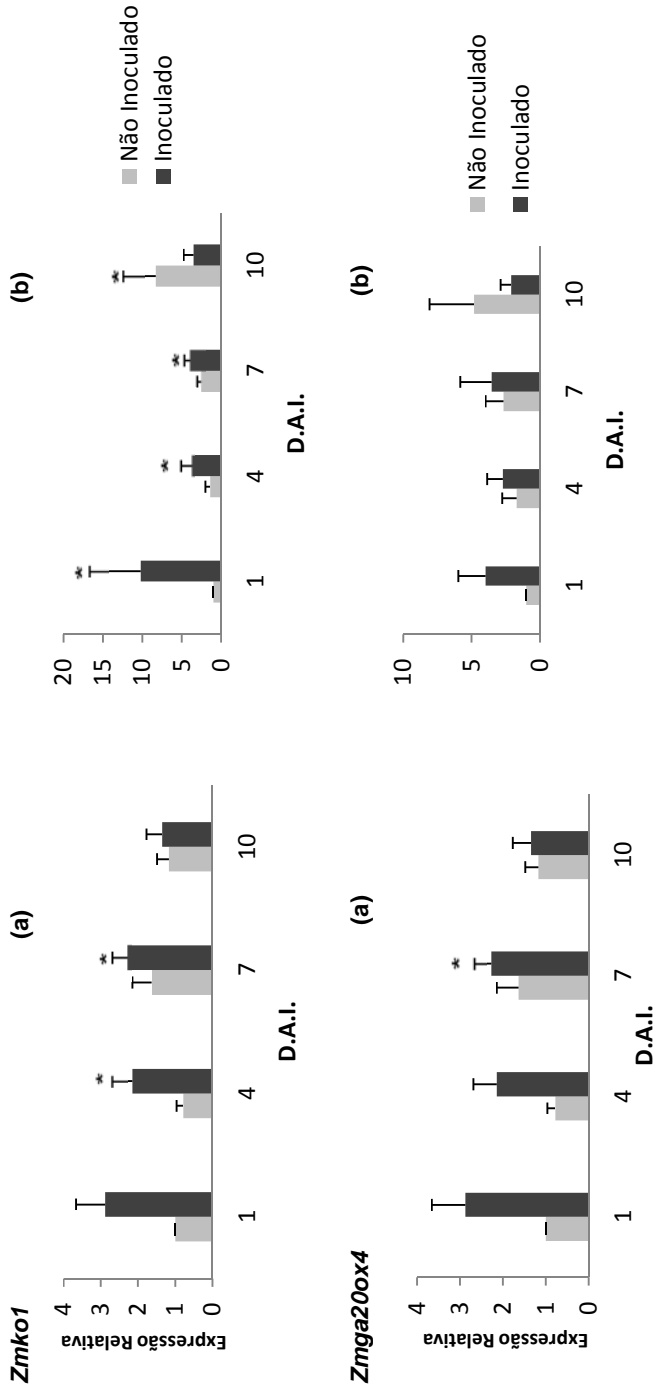


Figura 29. Expressão relativa dos genes *Zmko1* e *Zmga20ox4* em parte aérea (a) e em raízes (b) de plântulas de milho Pioneer 30F53 crescidas em substrato estéril e inoculadas com *Azospirillum brasilense* FP2. Amostras de plântulas inoculadas e não inoculadas foram coletadas 1, 4, 7 e 10 dias após a inoculação (D.A.I.). Quantidade relativa de transcritos foi calculada por qRT – PCR usando o método de Pfaffl (2001) modificado por Mcmaugh e Lyon (2003), e α – tubulina como gene de referência. Dados apresentados como Média \pm EP (n = 9). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas de acordo com Wilcoxon/Mann-Whitney ($p < 0,05$).

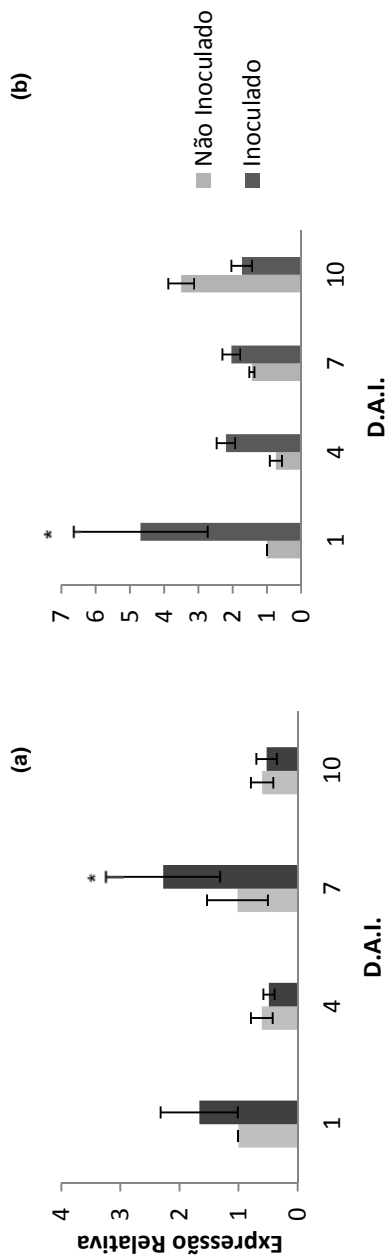


Figura 30. Expressão relativa *Zmact1* em parte aérea **(a)** e em raízes **(b)** de plântulas de milho Pioneer 30F53 crescidas em substrato estéril e inoculadas com *Azospirillum brasilense* FP2. Amostras de plântulas inoculadas e não inoculadas foram coletadas 1, 4, 7 e 10 dias após a inoculação (D.A.I.). Quantidade relativa de transcritos foi calculada por qRT – PCR usando o método de Pfaffl (2001) modificado por Mcmaugh e Lyon (2003), e α – tubulina como gene de referência. Dados apresentados como Média \pm EP (n = 9). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas de acordo com Wilcoxon/Mann-Whitney ($p < 0,05$).

6. Discussão:

Com o intuito de entender como ocorre a interação entre o milho e a bactéria *Azospirillum brasilense* FP2 nos primeiros momentos após a colonização das raízes do milho pela bactéria, este estudo focou em estudar como plântulas de milho respondem à inoculação por esta bactéria nos primeiros 10 D.A.I.

Inicialmente se realizou o experimento com a variedade DKB240 e cada uma das plântulas que receberam a bactéria foram inoculadas com 10^5 UFC. Para esta variedade não foi detectada diferença estatística entre as plântulas inoculadas e não inoculadas em nenhuma das variedades de crescimento analisadas. Por esta razão, optou-se por não utilizar esta variedade nas etapas subsequentes do trabalho, devido ao fato de que a literatura indica que a inoculação com esta bactéria induz ao aumento no número de raízes laterais e leva a um ganho de massa seca (BASHAN e DE-BASHAN, 2010; VARGAS *et al.*, 2012).

Como não houve diferenças entre os grupos no experimento com a variedade DKB240, decidiu-se, após consulta à literatura (VENDAN e THANGARAJU, 2007; MONTEIRO *et al.*, 2008), aumentar a quantidade de bactérias usadas para inocular cada uma das plântulas no experimento com as plântulas da variedade Pioneer 30F53. Dessa forma, cada uma das plântulas que receberam a bactéria foram inoculadas com 10^8 UFC de *A. brasilense* FP2. Para esta variedade foi possível, com relação às variáveis de crescimento, observar diferenças estatísticas com 10 D.A.I. para comprimento de folha, em que as plântulas inoculadas apresentaram maior comprimento médio em relação às não inoculadas. Nas demais variáveis avaliadas não houve diferença estatística entre os grupos (Figuras 14 e 15). Assim, os experimentos de expressão gênica e determinação e quantificação do DNA bacteriano em plântulas de milho foram realizados com a variedade Pioneer 30F53.

A partir de DNA extraído das amostras de parte aérea e raiz de milho inoculado com a bactéria *A. brasilense* foi possível

detectar a presença da mesma nas amostras de raiz inoculada por PCR convencional utilizando os iniciadores gênero específicos para esta bactéria (Tabela 3) (SHIME-HATTORI *et al.*, 2011). O fato de que os iniciadores utilizados para essa determinação não terem amplificado nenhuma sequência de milho é importante na medida em que possibilita um método fácil e rápido de identificação das bactérias do gênero *Azospirillum* que possam estar em associação com o milho (*Z. mays*). Essa identificação de *A. brasilense* logo após a inoculação foi realizada também por Bashan (1986). Este autor, entretanto, usou meio seletivo e determinou o NMP de células bacterianas presentes nas raízes de trigo. Já Molina-Favero (2008) determinou o NMP de células bacterianas por grama de peso seco de raízes de tomate por meio de cultura da bactéria extraída das raízes em meio NFb. Por outro lado, Guerrero-Molina (2012) usou a sequência do gene *nifD* para identificar a presença de *A. brasilense* no interior de raízes de morangueiros 7 meses após a inoculação.

Assim, a metodologia utilizada neste trabalho obteve resultados semelhantes aos observados anteriormente por outros autores, pois foi observado que a bactéria *A. brasilense* estava presente nas raízes de plântulas inoculadas desde 1 D.A.I e não estava presente na parte aérea destas plântulas (Tabela 3). Não houve amplificação de DNA bacteriano nas amostras tanto da parte aérea como de raiz de plântulas não inoculadas (Tabela 3). Segundo Vargas (2012) houve aumento no número de raízes laterais em plântulas de arroz inoculadas com *A. brasilense* sp245 com 10 D.A.I. . Cavallet (2000) visualizou os efeitos da inoculação de milho com um produto à base de *Azospirillum spp.* no período da colheita (maior número de grãos e comprimento médio das espigas). Já Junior (2008) verificou, 25 dias após a inoculação de plantas de milho com *Azospirillum amazonense* levou a um aumento na quantidade de nitrogênio e a um maior acúmulo de matéria seca nas raízes, devido, provavelmente, tanto ao mecanismo de fixação de nitrogênio quanto aos mecanismos de promoção de crescimento vegetal. Estes fatos associados aos nossos dados, que indicam que a bactéria já está presente no interior dos tecidos das raízes das plântulas de milho a 1 D.A.I., nos leva a supor que apesar da bactéria colonizar muito rapidamente os tecidos vegetais, os seus efeitos no

desenvolvimento da planta somente podem começar a ser percebidos com 10 D.A.I. , visto que, somente neste tempo de coleta conseguimos detectar um maior crescimento da parte aérea de plântulas inoculadas em relação às não inoculadas.

A partir deste resultado, foram desenhados dois pares de iniciadores para amplificar uma região de 96 pb e outra de 180 pb que se encontram dentro da região amplificada na PCR convencional usada para determinar a presença da bactéria em amostras de plântulas inoculadas (Anexo I). Estes iniciadores foram sintetizados com a finalidade de quantificar o DNA de *A. brasilense* presente em amostras de raiz e parte aérea de plântulas inoculadas. Depois de realizado um teste de amplificação por PCR convencional dos pares de iniciadores, o par *AznifA-F12* foi o único que gerou amplicon. Assim, este par de iniciadores foi utilizado no experimento de quantificação do DNA bacteriano nas amostras de raiz e parte aérea inoculadas com *A. brasilense*. Após submeter a sequência do amplicon a busca por BLAST (National Center for Biotechnology Information), verificou-se que houve homologia com somente uma região do genoma completo de *Azospirillum brasilense*, o que indica que este se encontra presente em cópia única no genoma da bactéria (Anexo II). Tal fato torna este gene um bom candidato para a quantificação do DNA bacteriano presente nas amostras de raiz e parte aérea de plântulas de milho, pois permite fazer a associação de que cada cópia indica a presença de uma bactéria. Assim, essa quantificação mostrou uma crescente quantidade de DNA bacteriano desde as amostras de 1 D.A.I. até 7 D.A.I. , e apresentou uma queda nas amostras de 10 D.A.I (Figura 24). Este padrão de crescimento foi parcialmente verificado por Bashan (1986), que observou, após 1 semana de inoculação, uma queda na quantidade de bactérias presentes nas raízes de trigo inoculadas com *A. brasilense*. Já Puente (1999) inoculou raízes de mangue com *A. brasilense* e observou um crescimento no número de UFC entre 2 e 4 D.A.I., seguida de uma queda no número de UFC para níveis abaixo da quantidade inicial, padrão este de crescimento parecido com o observado nos experimentos de quantificação de DNA bacteriano nas raízes de milho.

Com relação às análises de expressão gênica, foram detectadas diferenças principalmente nas amostras de raízes de milho. Dentre estas diferenças foi detectada uma maior expressão nas amostras inoculadas 1, 4 e 7 D.A.I. para os genes envolvidos no *burst* oxidativo e para a cadeia transdutora de sinal (Figura 26). Entretanto, em 10 D.A.I. não houve diferença entre a expressão das amostras inoculadas e não inoculadas para os genes envolvidos no *burst* oxidativo e uma repressão do gene *Zmmpk5* que codifica para uma das enzimas envolvidas na transdução de sinal por MAP quinases.

De acordo com Zhang (2010), logo após a percepção dos brassinoesteróides pela célula vegetal, ZmMPK5 é ativada pelo H_2O_2 apoplástico produzido pelas NADPH oxidases em resposta ao estímulo pelos brassinoesteróides. A ZmMPK5 ativada, por sua vez, leva ao acúmulo de H_2O_2 apoplástico via a indução da expressão do gene das NADPH oxidases (*rboh*), o que leva à formação de um loop de amplificação. Esse acúmulo de H_2O_2 induzido por brassinoesteróides estimula a atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante. Associado a isso, temos o fato de que, segundo Marino (2011 e 2012), em *Medicago truncatula* a síntese de *MtrbohA* está associado com a fixação de nitrogênio nos nódulos formados durante a interação com *Sinorhizobium meliloti*. Segundo o autor, quando a expressão deste gene decresce, há também um decréscimo na fixação de nitrogênio no nódulo, pois esta baixa expressão de *MtrbohA* também leva a uma baixa expressão dos genes do complexo da nitrogenase deste microrganismo. Tal fato, para o autor, é uma forte indicação de que este gene está envolvido na comunicação entre a planta e o microrganismo.

Dessa forma, quando comparamos a expressão dos genes *Zmmpk5*, *ZmrbohA* e *ZmrbohB* (Figura 26) com os dados de quantificação de DNA bacteriano nas raízes (Figura 24), pode-se verificar que a expressão destes genes nas plântulas inoculadas apresenta padrão semelhante ao observado na quantificação de DNA bacteriano. Isso é observado para o gene *ZmrbohA* em 1 e 7 D.A.I., e para o gene *ZmrbohB* em 4 e 7 D.A.I., quando a expressão destes genes nas amostras das plântulas inoculadas apresentam um aumento de 20 vezes de um tempo de coleta para outro e, com 10 D.A.I. não há diferença entre as amostras

de plântulas inoculadas e não inoculadas. A expressão do gene *Zmmpk5* também apresenta o mesmo padrão observado na quantificação de DNA bacteriano, em que a expressão nas plântulas inoculadas é maior que as não inoculadas em 1, 4 e 7 D.A.I. , e, em 10 D.A.I., há uma maior expressão nas plântulas não inoculadas em relação às inoculadas, o que mostra que ocorreu uma repressão da expressão deste gene nas amostras de plântulas inoculadas. Assim, as expressões observadas para os genes envolvidos no *burst* oxidativo (*ZmrbohA* e *ZmrbohB*) e de *Zmmpk5* (Figura 26) sugerem que a presença de *A. brasilense* FP2 nas raízes de milho induz à expressão do gene *Zmmpk5* nos primeiros dias de inoculação (1, 4 e 7 D.A.I.). O produto deste gene (ZmMPK5), por sua vez, leva a uma maior expressão dos genes das NADPH oxidases (*ZmrbohA* e *ZmrbohB*) nas amostras inoculadas quando comparadas com as amostras que não receberam a bactéria (Figura 26). Após isso, a queda na expressão do gene *Zmmpk5*, com 10 D.A.I., nas amostras de plântulas inoculadas leva a expressão dos genes das NADPH oxidases a níveis comparáveis às das plântulas não inoculadas (Figura 26). É possível, dessa forma, com base no que afirma (Zhang, Zhang *et al.*, 2010) e (Marino, Andrio *et al.*, 2011; Marino, Dunand *et al.*, 2012), supor que estes genes estão envolvidos na comunicação entre a bactéria e a planta (Figura 31).

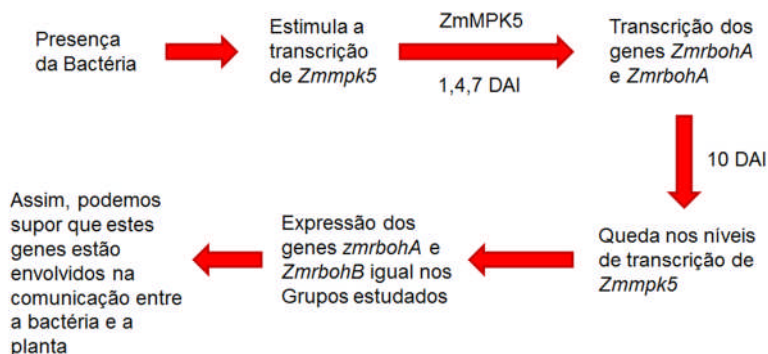


Figura 31. Esquema sobre a transcrição dos genes *Zmmpk5*, *ZmrbohA* e *ZmrbohB* em raízes de plântulas de milho inoculadas com *A. brasilense* FP2 (ZHANG *et al.*, 2010; MARINO *et al.*, 2011; MARINO *et al.*, 2012).

Além destes, também foi possível detectar diferenças estatísticas entre os grupos analisados para os genes envolvidos no transporte influxo e efluxo de auxinas. O transportador efluxo das auxinas (*Zmpin1a*), em parte aérea, apresentou uma diferença entre os grupos nas amostras com 7 e 10 D.A.I., em que a amostra de plântulas inoculadas apresentou maior expressão em 7 D.A.I. e a amostra com 10 D.A.I. apresentou menor expressão quando comparada com a respectiva amostra das plântulas não inoculadas. Já o transportador influxo de auxina apresentou diferença estatística entre os grupos analisados nas amostras de 7 D.A.I. em parte aérea e nas amostras de 1 a 7 D.A.I. de raiz.

Azospirillum brasilense é capaz de produzir auxinas a partir de triptofano liberado pela planta (ONA *et al.*, 2005) e os transportadores influxo e efluxo de auxina são responsáveis por manterem o fluxo normal deste hormônio na raiz e na parte aérea da planta, evitando que esta se acumule em alguma parte da planta (PERET *et al.*, 2012). Assim, o padrão de expressão em raiz do transportador influxo de auxina, que é crescente até 7 D.A.I. nas plântulas inoculadas e não apresenta em 10 D.A.I. diferença em relação às plântulas não inoculadas, acompanha o

crescimento do número de bactérias em raiz até 7 D.A.I. e sua queda com 10 D.A.I.(Figura 28). Esses fatos levam à proposta de que as bactérias estão ativamente produzindo auxinas durante a interação com a planta, e em quantidades suficientes para que esta induza resposta na parte aérea da planta, pois com 7 D.A.I., ambas as amostras, de raiz e de parte aérea, apresentaram uma maior expressão nas plântulas inoculadas quando comparado com as não inoculadas, o que coincide com a maior quantidade detectada de DNA bacteriano na raiz das plântulas. Dessa forma, como há uma maior produção deste hormônio, há uma maior necessidade destes transportadores para evitar o acúmulo de auxinas no local onde as bactérias colonizam as raízes das plântulas (Figura 32).

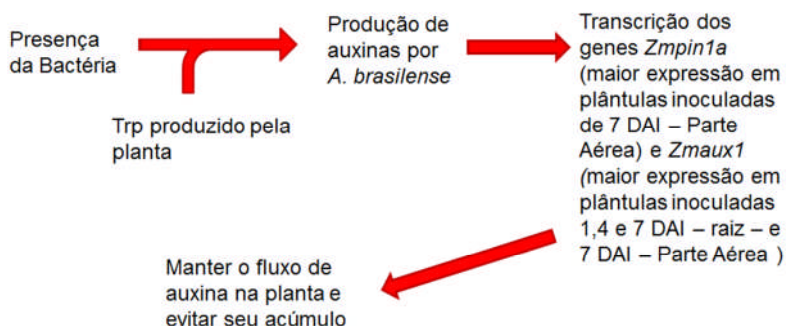


Figura 32. Esquema sobre a transcrição dos genes *Zmpin1* e *Zmaux1* em plântulas de milho inoculadas com *A. brasilense* FP2 (ONA *et al.*, 2005; PERET *et al.*, 2012).

Já entre os genes envolvidos na síntese de giberelinas, foi possível detectar diferenças entre os tratamentos para ambos os genes em todas as amostras, na exceção das amostras de raiz e das amostras de 1, 4 e 10 D.A.I. para parte aérea do gene *Zmga20ox4*, em que não foi detectada diferença estatística entre os tratamentos (Figura 29). Também não foram observadas diferenças na expressão gênica nas amostras de parte aérea de 1 e 10 D.A.I para o gene *Zmko1* (Figura 29). Para o gene *Zmga20ox4*, que codifica a enzima giberelina 20 oxidase 4,

somente houve diferença estatística entre as plântulas inoculadas e não inoculadas em 7 D.A.I. para parte aérea de plântulas. Esse resultado é esperado uma vez que *A. brasilense* é capaz de realizar a 3 β -hidroxilação de formas inativas de giberelinas presentes em raízes na sua forma ativa (GA_1) além de produzir diretamente giberelinas (CASSÁN *et al.*, 2001), o que leva à ativação das vias de resposta a esse hormônio e, conseqüentemente, à inibição por feedback da transcrição do gene *Zmga20ox4* (HEDDEN e PHILLIPS, 2000). A maior produção do mesmo gene nas plântulas inoculadas de 7 D.A.I. em relação às não inoculadas também pode ser explicado pela presença da bactéria, como este foi o momento em que foi detectada a maior quantidade de bactérias na planta (Figura 24), a produção extra de auxinas por essas bactérias provavelmente estimulou a transcrição do gene *Zmga20ox4* (HEDDEN e PHILLIPS, 2000). Por outro lado, verificou-se que a presença da bactéria nas raízes das plântulas foi capaz de estimular a transcrição do gene *Zmko1* tanto em raiz quanto na parte aérea (Figura 29). Na parte aérea com 4 e 7 D.A.I. houve maior expressão de *Zmko1* nas plântulas inoculadas e na raiz houve maior expressão das plântulas inoculadas nas amostras de 1 a 7 D.A.I. e repressão desta expressão com 10 D.A.I. no mesmo grupo em relação às plântulas não inoculadas. Segundo (SONG *et al.*, 2011), a produção da enzima ent- kaurene oxidase foi estimulada após se deixar as sementes de milho imersas em uma solução contendo GA_3 por 72 horas e depois postas para germinar por 3 dias. Aliando a este fato, sabe-se que *A. brasilense* produz ativamente as giberelinas GA_1 e GA_3 (BOTTINI *et al.*, 2004) e também é capaz de metabolizar intermediários da via de síntese de giberelinas para gerar GA_1 (CASSÁN *et al.*, 2001). Assim, a expressão observada para o gene *Zmko1* pode ser explicada pela produção de giberelinas pela bactéria associada com a produção normal da planta produzindo um padrão de expressão parecido com o observado por (SONG *et al.*, 2011), entretanto o pico de expressão nas plântulas inoculadas foi observado com 1 D.A.I. seguido por uma queda contínua na expressão até a sua repressão com 10 D.A.I. Esse padrão diferente de expressão é provavelmente causado pela produção de giberelinas pela bactéria durante a interação. Já na parte aérea houve uma maior expressão com 4 e 7 D.A.I. nas plântulas inoculadas em relação às não inoculadas. Segundo

Metzger e Zeevaart (1980), há evidências da presença de giberelinas nos exudados de xilema e floema. Isto, de acordo com o autor, indica que há transporte de giberelinas pela planta via xilema e floema. Aliado a isso, tem-se o fato de que de acordo com Song (2011) GA₃ é capaz de estimular a expressão do gene *Zmko1*. Por fim, como *A. brasilense* produz ativamente GA₃ e GA₁ (CASSÁN *et al.*, 2001), podemos inferir que a expressão observada em parte aérea para o gene *Zmko1* pode ser devida às giberelinas produzidas na raiz por *A. brasilense* e translocadas, via xilema, para a parte aérea. Por fim, de acordo com Kaneko (2003), as formas ativas de giberelinas são sintetizadas nos seus sítios de utilização. Dessa forma, podemos supor que a expressão em parte aérea dos genes *Zmko1* e *Zmga20ox4* em 4 e 7 D.A.I. (Figura 28) são responsáveis pelo maior comprimento de parte aérea observado com 10 D.A.I. (Figura 16 e 33).

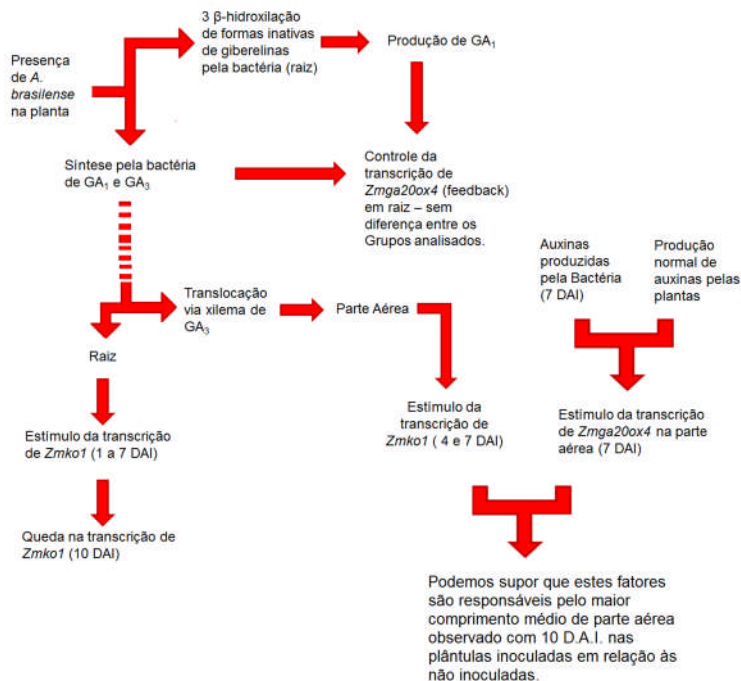


Figura 33. Esquema sobre a transcrição dos genes *Zmko1* e *Zmga20ox4* em plântulas de milho inoculadas com *A. brasilense* FP2 (METZGER e ZEEVAART, 1980; HEDDEN e PHILLIPS, 2000; CASSÁN *et al.*, 2001; BOTTINI *et al.*, 2004; SONG *et al.*, 2011)

Também houve diferença estatística entre os tratamentos nas amostras de 1 D.A.I. em amostras de raiz e para 7 D.A.I. em amostras de parte aérea (Figura 30) para a expressão da α -actina. O padrão de expressão observado indica que a presença da bactéria estimula a produção de actina em raiz 1 D.A.I. quando comparada com as plântulas não inoculadas com mesmo tempo de coleta, nos demais tempos não houve diferenças estatísticas entre plântulas inoculadas e não inoculadas. Já na parte aérea, somente em 7 D.A.I. houve diferença estatística. Essa expressão em parte aérea pode explicar, juntamente com a

maior expressão do gene *Zmga20ox4* nas plântulas inoculadas, o maior crescimento médio observado com 10 D.A.I. nas plântulas inoculadas, pois o crescimento observado em parte aérea pode ser explicado pela maior produção de giberelinas ativas (produzidas pela planta e pela bactéria) e pelo acúmulo de actina. Este mesmo crescimento não foi observado para as amostras de raiz. Nas amostras de raiz, apesar de ter havido maior expressão de actina na amostra de plântulas inoculadas de 1 D.A.I., não foi observado um crescimento da raiz ou no número de raízes laterais estatisticamente diferente neste grupo. Este fato ocorreu provavelmente porque não houve tempo suficiente para que houvesse uma resposta à produção bacteriana de auxinas.

7. Conclusões e Perspectivas

Com base nos dados analisados, podemos supor que o milho (*Z. mays*) responde à interação com a bactéria (*A. brasilense*) desde os primeiros momentos da inoculação. Primeiramente há o reconhecimento desta bactéria pela planta, pois ela ativa a transcrição dos genes das enzimas envolvidas na cadeia de transdução de sinal, que, por sua vez, ativam a transcrição dos genes envolvidos no *burst* oxidativo, ambos grupos de genes envolvidos na resposta a estresses bióticos e abióticos (Zhang, Jiang *et al.*, 2006; Samajova, Plihal *et al.*, 2012). Os genes envolvidos no *burst* oxidativo são transcritos em maior quantidade nas amostras de plântulas inoculadas até 7 D.A.I. e com 10 D.A.I. não há mais diferença na produção entre os grupos analisados, enquanto que para o gene *Zmmpk5* há maior expressão deste nas amostras de plântulas inoculadas de 1 a 7 D.A.I., e depois há uma diminuição na expressão deste com 10 D.A.I. . Tais fatos, associados com a queda em 10 D.A.I. da quantidade de bactérias em amostras de raiz, indica que a colonização foi estabelecida e que a planta, aparentemente, está

controlando a quantidade de bactéria em seus tecidos nas condições de cultivo utilizadas neste experimento. Além disso, os dados de expressão dos genes dos transportadores efluxo e influxo de auxina e dos genes envolvidos na síntese de giberelinas sugerem que houve a produção tanto de auxina quanto de giberelinas pela bactéria. Pode-se supor isso devido ao fato que não houve diferença estatística entre os Grupos analisados para a transcrição do gene *Zmga20ox4*, que é controlada pelos níveis de giberelina na planta, e o estímulo à transcrição do gene *Zmko1* que tem sua transcrição estimulada pelas quantidades de giberelinas presentes na planta (Song, Guo *et al.*, 2011), além de que houve também expressão dos genes envolvidos no transporte de auxina que respondem diretamente aos níveis de auxina na planta. Dessa forma, podemos dizer que a planta responde prontamente à interação com a bactéria.

Assim, com a finalidade de entender melhor como a planta reage à presença da bactéria se recomenda que se realize estudos com tempos de coleta maiores que 10 D.A.I. para que se possa detectar diferenças entre as variáveis de crescimento. Também se recomenda que se realize estudos de expressão gênica focando nos genes de bactéria responsáveis pela síntese das auxinas para averiguar quando está havendo a produção deste fitormônio e verificar, por meio de estudos de expressão gênica, com esta se relaciona com a síntese de triptofano pelo milho. Estudos expressão gênica focando nas primeiras horas da colonização se mostram igualmente importantes, visto que a bactéria foi detectada com 1 D.A.I. em amostras de raiz de plântulas inoculadas.

Referências Bibliograficas

ALEXANDROV, N. N. et al. Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing. **Plant Mol Biol**, v. 69, n. 1-2, p. 179-94, Jan 2009. ISSN 0167-4412

ARCONDEGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 65, n. 1, p. 80-105, Mar 2001. ISSN 1092-2172

ATKINSON, N. J.; URWIN, P. E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 10, p. 3523-3544, 2012.

BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnol Lett**, v. 32, n. 11, p. 1559-70, Nov 2010. ISSN 1573-6776

BALSANELLI, E. et al. Herbaspirillum seropedicae rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. **Environ Microbiol**, v. 12, n. 8, p. 2233-44, Aug 2010. ISSN 1462-2920

BASHAN, Y. Enhancement of Wheat Root Colonization and Plant Development by Azospirillum brasilense Cd. Following Temporary Depression of Rhizosphere Microflora. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, p. 1067-1071, 1986.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth—A Critical Assessment. In: INC., E. (Ed.). *Advances in Agronomy*, v.108, 2010. cap. 2, p.77-136. ISBN 00652113.

BAULY,J.; ROUX, C.; DARGEVICIUTE,A.; PERROT-RECHENMANN, C. Identification of a novel marker for auxin and ethylene cross-talk from tobacco seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 803-811, 2002.

BISHOPP, A.; MAHONEN, A. P.; HELARIUTTA, Y. Signs of change: hormone receptors that regulate plant development. **Development**, v. 133, n. 10, p. 1857-69, May 2006. ISSN 0950-1991

BLAKESLEE, J. J.; PEER, W. A.; MURPHY, A. S. Auxin transport. **Curr Opin Plant Biol**, v. 8, n. 5, p. 494-500, Oct 2005. ISSN 1369-5266

BOTTINI, R.; CASSAN, F.; PICCOLI, P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 65, n. 5, p. 497-503, Oct 2004. ISSN 0175-7598

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. REGULAÇÃO DA ABSORÇÃO E ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO NAS PLANTAS. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000. ISSN 0103-8478.

BURG, S. E.; THIMANN, K. V. The physiology of ethylene formation in apples. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 45, p. 335-344, 1959.

CARRARO, N. et al. ZmPIN1a and ZmPIN1b encode two novel putative candidates for polar auxin transport and plant architecture determination of maize. **Plant Physiol**, v. 142, n. 1, p. 254-64, Sep 2006. ISSN 0032-0889

CASSÁN, F.; BOTTINI, R.; SCHNEIDER, G.; PICCOLI, P.
Azospirillum brasilense and Azospirillum lipoferum Hydrolyze Conjugates of GA20 and Metabolize the Resultant Aglycones to GA1 in Seedlings of Rice Dwarf Mutants1. **Plant Physiology**, v. 125, p. 2053–2058, 2001.

CASSÁN, F. et al. Azospirillum brasilense Az39 and Bradyrhizobium japonicum E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (Zea mays L.) and soybean (Glycine max L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 28-35, 2009.

CAVALLET, L. E. ; PESSOA, A. C. S.; HELMICH, P. R.; HELMICH, J. J. Produtividade do Milho em Resposta à Aplicação de Nitrogênio e Inoculação das Sementes com Azospirillum spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, n. 1, p. 129-132, 2000.

CHEN, J. F.; GALLIE, D. R. Analysis of the functional conservation of ethylene receptors between maize and Arabidopsis. **Plant Mol Biol**, v. 74, n. 4-5, p. 405-21, Nov 2010. ISSN 1573-5028

DING, H. et al. Identity of an ABA-activated 46 kDa mitogen-activated protein kinase from Zea mays leaves: partial purification, identification and characterization. **Planta**, v. 230, n. 2, p. 239-51, Jul 2009. ISSN 1432-2048

DINON, A. Z.; DE MELO, J. E.; ARISI, A. C. M. Monitoring of MON810 genetically modified maize in foods in Brazil from 2005 to 2007. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 6, p. 515-518, 2008. ISSN 08891575.

DÖBEREINER, J., DAY, L. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In Proceedings First **International Symposium on Nitrogen Fixation**, p. 518–538, 1976

EGENER, T.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Endophytic Expression of nif Genes of Azoarcus sp Strain BH72 in Rice Roots. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n. 9, p. 813-819, 1999.

ELMERICH, C. et al. Regulation of NIF Gene Expression and Nitrogen Metabolism in Azospirillum. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5/6, p. 847-852, 1997.

EMBRAPA INFORMÁTICA AGROPECUÁRIA. **Circular Técnica nº 74**: Aspectos Econômicos da Produção e Utilização do Milho. 2006. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/producaoutil/milho_000fghw1d5602wyiv80drauenaku42b6.pdf>. Acesso em: 26 maio 2011.

FAO. FAOSTAT. 2011. Disponível em: <
<http://faostat3.fao.org/home/index.html#VISUALIZE>>. Acesso
 em: 11/03/2013.

FORESTAN, C.; MEDA, S.; VAROTTO, S. ZmPIN1-mediated auxin transport is related to cellular differentiation during maize embryogenesis and endosperm development. **Plant Physiol**, v. 152, n. 3, p. 1373-90, Mar 2010. ISSN 1532-2548

FORNASIERI FILHO, D. **A Cultura do Milho**. Jaboticabal : FUNEP, 1992. 273p.

GALLIE, D. R.; YOUNG, T. E. The ethylene biosynthetic and perception machinery is differentially expressed during endosperm and embryo development in maize. **Mol Genet Genomics**, v. 271, n. 3, p. 267-81, Apr 2004. ISSN 1617-4615

GRIGG, D. B. Green Revolution. International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences. LTD, E. S. 2001.

GUERRERO-MOLINA, M. F.; WINIK, B. C.; PEDRAZA, R. O. More than rhizosphere colonization of strawberry plants by *Azospirillum brasilense*. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 205-212, 2012. ISSN 09291393.

HEDDEN, P.; PHILLIPS, A. L. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. **Trends Plant Sci**, v. 5, n. 12, p. 523-530, 2000. ISSN 1360-1385.

HIRANO, K.; UEGUCHI-TANAKA, M.; MATSUOKA, M. GID1-mediated gibberellin signaling in plants. **Trends Plant Sci**, v. 13, n. 4, p. 192-9, Apr 2008. ISSN 1360-1385

HUERGO, Luciano Fernandes. **Regulação do metabolismo de nitrogênio em Azospirillum brasilense**. 2006. 187 f. Tese (Doutorado) - Curso de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1-2, p. 413-425, 2010.

JUNIOR, F. B. D. R. et al. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em Dois Genótipos de Milho sob Diferentes Regimes de Nitrogênio. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 32, p. 1139-1146, 2008.

KANEKO, M. et al. Where do gibberellin biosynthesis and gibberellin signaling occur in rice plants? **The Plant Journal**, v. 35, n. 1, p. 104-115, 2003.

KŘEČEK, P. et al. The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. **Genome Biology**, v. 10, 2009.

LAMB, C.; DIXON, R. A. THE OXIDATIVE BURST IN PLANT DISEASE RESISTANCE. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 48, p. 251-75, 1997.

LJUNG, K et al. Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots. **Plant Cell.**, v. 17, p. 1090-1104, 2005.

LJUNG, K.; BHALERAO, R. P.; SANDBERG, G. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. **Plant.**, v. 1, n. 29, p. 465-474, 2001.

MACHADO, A. T. et al. Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho Nitroflint. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 33, p. 961-970, 1998.

MARINO, D. et al. A Medicago truncatula NADPH oxidase is involved in symbiotic nodule functioning. **New Phytol**, v. 189, n. 2, p. 580-92, Jan 2011. ISSN 1469-8137

MARINO, D. et al. A burst of plant NADPH oxidases. **Trends Plant Sci**, v. 17, n. 1, p. 9-15, Jan 2012. ISSN 1878-4372

MCMAUGH, S. J.; LYON, B. R. Real-time quantitative RT-PCR Assay of Gene Expression in Plant Roots during Fungal Pathogenesis. **BioTechniques**, v. 34, n. 5, p. 982-986, 2003.

MELLO, C. S. et al. Sodium nitroprusside modulates gene expression involved in glutathione synthesis in Zea mays leaves. **Biologia Plantarum**, v. 56, n. 2, p. 383-388, Jun 2012. ISSN 0006-3134.

METZGER, J. D.; ZEEVAART, J. A. D. Comparison of the Levels of Six Endogenous Gibberellins in Roots and Shoots of Spinach in Relation to Photoperiod. **Plant Physiol.**, v. 66, p. 679-683, 1980.

MOLINA-FAVERO, C. et al. Aerobic Nitric Oxide Production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and Its Influence on Root Architecture in Tomato. **MPMI**, v. 21, n. 7, p. 1001-1009, 2008.

MONTEIRO, R. A. et al. Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, Poaceae) roots by *Herbaspirillum* (Burkholderiales, Oxalobacteraceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 4, p. 932-937, 2008.

ONA, O. et al. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. **FEMS Microbiol Lett**, v. 246, n. 1, p. 125-32, May 1 2005. ISSN 0378-1097

PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntrC* (*glnG*) type genes. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 55, p. 95-101, 1984.

PERET, B. et al. AUX/LAX Genes Encode a Family of Auxin Influx Transporters That Perform Distinct Functions during Arabidopsis Development. **Plant Cell**, 2012.

PERRIG, D. et al. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*,

and implications for inoculant formulation. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 75, n. 5, p. 1143-50, 2007.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

POLETO, N. Adição de carbono e nitrogênio e sua relação com os estoques no solo e com o rendimento do milho em sistemas de manejo. 2004. (Master). PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

PUEENTE, M. E. et al. Root-surface colonization of black mangrove seedlings by *Azospirillum halopraeferens* and *Azospirillum brasilense* in seawater. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 29, p. 283-292, 1999.

PUEENTE, M. I.; GARCIA, J. E.; ALEJANDRO, P. Effect of the Bacterial Concentration of *Azospirillum brasilense* in the Inoculum and its Plant Growth Regulator Compounds on Crop Yield of Corn (*Zea Mays*) In the Field. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 5, p. 604-608, 2009.

RIBAUDO, C. M. et al. *Azospirillum* sp. Promotes Root Hair Development in Tomato Plants through a Mechanism that Involves Ethylene. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 25, n. 2, p. 175-185, 2006.

SAMAJOVA, O. et al. Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. **Biotechnol Adv**, 2012.

SANTOS, M. F. et al. Proteome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with sugarcane plantlets. **J Proteomics**, v. 73, n. 5, p. 917-31, Mar 10 2010.

SHIME-HATTORI, A. et al. A rapid and simple PCR method for identifying isolates of the genus *Azospirillum* within populations of rhizosphere bacteria. **J Appl Microbiol**, v. 111, n. 4, p. 915-24, Oct 2011.

SIMON, S.; PETRASEK, J. Why plants need more than one type of auxin. **Plant Sci**, v. 180, n. 3, p. 454-60, 2011.

SONG, J. et al. Genome-wide identification of gibberellins metabolic enzyme genes and expression profiling analysis during seed germination in maize. **Gene**, v. 482, n. 1-2, p. 34-42, 2011.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 487-506, 2000.

SUI, Z. et al. Cloning and expression analysis of some genes involved in the phosphoinositide and phospholipid signaling pathways from maize (*Zea mays* L.). **Gene**, v. 426, n. 1-2, p. 47-56, Dec 15 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: ARTMED, 2009.

TANIMOTO, M.; ROBERTS, K.; DOLAN, L. Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 08, p. 943-948, 1995.

TILMAN, D. et al. Forecasting agriculturally driven global environmental change. **Science**, v. 292, n. 5515, p. 281-4, Apr 13 2001.

TROMAS, A.; PERROT-RECHENMANN, C. Recent progress in auxin biology. **Comptes Rendus Biologies**, v. 333, n. 4, p. 297-306, 2010.

UNITED NATIONS. **World Population Prospects - The 2008 Revision**. United Nations. New york. 2009

VARGAS, L. et al. Early responses of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant and bacterial genotypes. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 127-137, 2012.

VENDAN, R. T.; THANGARAJU, M. Development and standardization of cyst based liquid formulation of *Azospirillum* bioinoculant. **Acta Microbiol Immunol Hung**, v. 54, n. 2, p. 167-77, 2007.

VERNA et al. Impact of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Crop Production. **Internacional Journal of Agricultural Research**, v. 5, n. 11, p. 954-983, 2010.

WANG, K. L. C.; LI, H.; ECKER, J. R. Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. **The Plant Cell**, v. 14, p. S131-S151, 2002.

WEBER, M. A.; MIELNICZUK, J. ESTOQUE E DISPONIBILIDADE DE NITROGÊNIO NO SOLO EM EXPERIMENTO DE LONGA DURAÇÃO. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 33, p. 429-437, 2009.

YAMAGUCHI, S.; KAMIYA, Y. Gibberellin Biosynthesis: Its Regulation by Endogenous and Environmental Signals. **Plant CellPhysiol.**, v. 41, n. 3, p. 251-257, 2000.

ZHANG, A. et al. Mitogen-activated protein kinase is involved in abscisic acid-induced antioxidant defense and acts downstream of reactive oxygen species production in leaves of maize plants. **Plant Physiol**, v. 141, n. 2, p. 475-87, Jun 2006.

ZHANG, A. et al. ZmMPK5 is required for the NADPH oxidase-mediated self-propagation of apoplastic H₂O₂ in brassinosteroid-induced antioxidant defence in leaves of maize. **J Exp Bot**, v. 61, n. 15, p. 4399-411, 2010.

ZHAO, Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. **Annu Rev Plant Biol**, v. 61, p. 49-64, 2010.

Anexo I – Sequência do gene *AznifA* de *Azospirillum brasilense* FP2

Número de Acesso no GenBank: AY677086.1

Artigo de referência:

Regulation of *Azospirillum brasilense* nifA gene expression by ammonium and oxygen

AUTHORS: Fadel-Picheth,C.M., Souza,E.M., Rigo,L.U., Funayama,S., Yates,M.G. and Pedrosa,F.O.

JOURNAL FEMS Microbiol. Lett. 179 (2), 281-288 (1999)

O artigo faz referência à sequência de nifA obtida para FP2 – não definitiva.

Legenda:

- Sequência em amarelo : Shime-Hattori (2011).
- Sequência em vermelho : amplicon obtido na qRT-PCR (Este Trabalho).
- Sequências em Negrito : Iniciadores Reverso e Direto utilizados.

CTGCGCCGCGGCCTCGTTTCGACAGGCCGTTTCGCGGCCACG
 AGACGCAGCACATTGTCCTCGCCGACCAGATAGACGCGCCC
 GCGGTGCATCTGAAGCTGGTAGGCCAGCGCGCGAAGCACT
 TCGCGCAACGTCTGCTGGAGGTCGAGAGAGGAACCGAGGA
 TCTTGCTGACCTCATAGAT**TGGTCAGCAGTTCCAGGTTTCGAC**
GTGGACTGGCGCATTGCACCCGGCATGATCGACACCCCCTG
CTCAACCGGGACTCCGGACGCCGCGCACCGGCGCGCTCGT
CGAATTGATCCCGGCACGGCGCCTTGAACCGTTCCTCCCGG
GGTGGGGTGTGCGCTCGTTGCTGATCGGCGCCTTTGACCAC
CGGTGCGCCCGCCGC**GCGTGCTTCCGTGACAAGCCGTTCG**
CGCTGCGGACTGTGAAAGTTTCGGAAACTCTCGGTGAAA
GGCAAGCCC**TTTTGCATATCAGTTGCTGCG**GCGCACAAATGA
 CTTATGGCTGCGGCAGAACGGCGCAACCCTTGAGAAAAGTGA

GAGTTTCTGCCGCTGAACATCTAATAACTGACCGGTGAGTAA
 TATTTTCTCCACCCTGGAGGACGGTATGCCGGAGGATGATC
CCGCCGTTCCGCGCTGGCGCCGCCGCAAGGAGGCGCGCC
 CCCGGGAGATCGTCGACGCCGCCCTGACCGTCTTCGGCGA
 GCGCGGCTTCGCGGCGGCCCGGCTGGAGGATGTCGCGGC
 GCAGGCCGGGGTCAGCAAGGGCACGCTCTACCTCTACTTCC
 CGAACAAGGAGGAGTTGTTCAAGGCGGTGGTCCGCGAGGC
 CATCCTGCCCAACCTGGACATGGCCGAGCGTCTGCTGGCC
 GGGGCGCAGGGGGCCGAGCTTCGCCGTTCTGGAAACGCTGC
 TGACCCTCTTCGCGACGCGCATCCTGAAATCGCGCGCCGGC
 GCCATCCCCAAGCTGATCATCGCCGAGGCCGGCAATTTTCC
 CGATCTCGCCCGCTTCTATTACGACGAGGTGATCCGCCGCG
 CCTTCGCCCTGCTGGCGGCGGTGCTGGAGCGCGGCATGGC
 GCGCGGGGAGTTCCGCCCGGTGGACGTCGACTCGACCGTC
 CGCCTGATCGTCGCACCGATGCTGATGAGCGCGCTGTGGC
 GCTCCTCCTTCAAGCGCTGGAGGGCCGCCCGCCGGACGT
 GGCGGCGCTGCTGGCCGCCATCTCGACGCGCTGCGCCGG
 ACGCTCGCCCCGGAGGGAGGGTCGCCGTCATGAGCTGGAT
 CGCCGAAACGCTGGCGGCGGCCCTGGCCGTCCTCGGGCTG
 GGCGGCGGGGACGCCGTGCCGCTGGCCACGGCTACGCC
 GAAGGGGAATATCTCCGCATCGCCGCCCGGTGGCCGGGA
 CGCTCGACACGCTGGCGGTGACGCGCGGCGGGCGGGTTG
 AGGCGGGCGCGCCCTCTTCGCGCTCGACCGCACAGCGC
 GCGGGCGGAGCGCGACCGGCTGGCCGCCGCGCTGGGGCA
 GGCGCGGGCGGAGCTGGCCGACCTGCGGACGGGCCGGCG
 CCCCCAGCAGCTGGCGGTGGTTTCCGCCAGCGCGCGCAG
 GCCGAGGCGGCGCTGCGCTATTCCGAAGTGGAACCTGGCGC
 GGCAGCAGACGCTGGTGGCGCGCAAGGTCAGCTCCGACGA
 CCGGCTGGACGCCGCCCGCGCCAGCCGCGACGGCGACCG
 CGCGCGGCTGGAGGAGCTGACCGCGCAACTGGCCGTCTCC
 AACCTGCCGGCCCGTCCCGAGCAGATCCGCGCCGCCGAGA
 ACGCCGTGCCCCAGGCCGAGGCGGCCCTGGCCAGGCGG
 ACAAGCGCCTACCGAATTGGCCCCGCCGGCGCCCGAGGC
 GGCGCTGGTCGAGGACACGCTGTTCAACCCCGGCGAATGG
 GTGCCGGCGGGCGCCCCGGTGGTGTGCTGCTGCCGCCG
 GGAAAGCGGAAGCTGGTGGTCTTCGTTCCGGAACCTGCTGAT
 GGCCCGCGTCCGTCCGGGCGACCGGGTGACGGTGCGCTG
 CGACGGCTGCCCGCCGGCCTGTCGGCGCGCGTGACCTAT
 GTGGCGCCGCGGGTGGAATACACCCCGCCGGTGATCTACA
 GCGTCGGCAGCCGCGAGAAGCTGGTCCGCGCTCGAGGC
 GCGGCTGGAGGACGGGGCGACGCTCAACCCCGGCCTGCC

GGTGGACGTGGAAGTGCCGCCATGACCGGGGAGCCCGCCA
TCGACGTGCGCGGTCTGGTCAAGCGCTTCGGCGCCAAGAC
GGTGGTGGACGGCTTCTCCATCCAAGTGGCGCGCGGGCAG
ATCTACGGCTTCCTGGGGCCGAACGGGTCCGGGCAAGACGA
CGACCATCCGCATGCTCTGCGGGCTGCTGACACCCGATGC
GGGGGTGGGGACCTGCCTCGGGCTCGACATCCGCGGCCAG
AGCGCCGCCATCAAGCGGCAGGTCCGGCTACATGACCCAGA
AGTTCAGCTTTTTGGGAGGATCTGAGCATCGCCGAGAATCTG
GATTCGTTGCCCGCATGTACGGGCTGCCGGACCGGCGGA
CCAAGGTGCGCGGGGCGTGGAACGGCTTGGGCTGGGCAA
CCGGCGGGCGCAGCTCGCCGGGGAATTGTCCGGCGGGCTG
GAAGCAGCGTCTGGCGCTGGCCGCCTGCATCCTGCATGAG
CCGAAGCTGCTGCTGCTCGACGAGCCGACCGCCGGCGTCTG
ACCCCAAGGCGCGACGGGAGTTCTGGGACGAGATTCACCG
GCTGGCCGGCGACGGGCTGACCGTGCTGGTCAGCACTCAT
TACATGGACGAGGCGGAACGCTGTCACGCCATCGCCTATCT
CGCCTACGGCCGGCTGATGACCCAGGGCAGCGTGGAGGAG
GTGATCGCCAACTCGGGTCTGGTCACCTACGAAGTCGGCGC
GCGGGGGGCGGACGGACCGGACCTCGGGCGCGTCGCGGC
GGAGTTGCGCGACCGTCCGGGCGTCGAGATGGTTGCCGCC
TTCGGTACCCGGCTGCATGTCAGCGGCGGCGACGGCGCGG
AACTGGAGGAGGCGTTGCGCCCCTGGGCCGGCGACCCGGC
CCTGTTGGTGCGACGGACGGAGCCGACGCTGGAGGATGTG
TTCATCCATCTGATGAATCGCAGCACGGACAACCTTCGCATGA
CCGAGCCGCCGCAGGGCAGGGCAGAACCGTCCCCGCACCA
TCGCGACAGCCGGTGCGGGGACGGTGCGCGATCACTCGAT
CGACGCGGAGGTCACGCCGGTGTTCTTGTTCCAGCGCAGC
GTCAGCTTGGAGATCTTGAGAGGTTTCAGGTTCTGCCAGAC
CGCCGACTCGCCGTCGTCGTAGATGACCTTCATGTCCCACT
TGCAGGTCTTCTCGGCCTTGTCGAAGCTCAGTTC

Anexo II – BLAST da sequência do amplicon com 96 pb do gene *AznifA* de *Azospirillum brasilense*

BLAST ®

Basic Local Alignment Search Tool

NCBI/ [BLAST/ blastn suite/](#) Formatting Results - A4GT72SV01R

[Formatting options](#)

[Download](#)

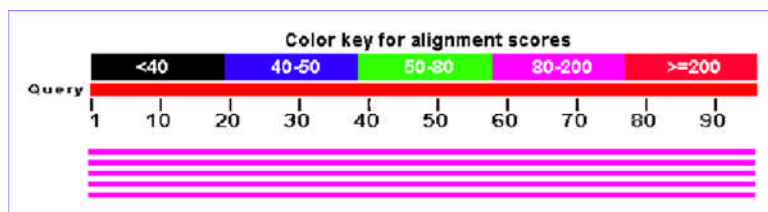
[View these results in the new enhanced report](#) [Learn about the enhanced report](#)

Nucleotide Sequence (96 letters)

Query ID	lcl 15551	Database Name	nr
Description	None	Description	Nucleotide collection (nt)
Molecule type	nucleic acid	Program	BLASTN 2.2.27+
Query Length	96		

Graphic Summary

Distribution of 5 Blast Hits on the Query Sequence



Descriptions

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem

BioAssay

Accession Description

		Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AF288483.3	Azospirillum brasilense NifA (nifA) gene, complete cds	178	178	100%	6e-42	100%	
HE577327.1	Azospirillum brasilense Sp245 main chromosome complete genome	172	172	100%	3e-40	99%	
AY677086.1	Azospirillum brasilense NifA (nifA) gene, partial cds; and unknown genes	172	172	100%	3e-40	99%	
X60714.1	A.brasilense nifA gene	172	172	100%	3e-40	99%	
D13799.1	Azospirillum lipoferum gene for NifA protein, complete cds	172	172	100%	3e-40	99%	

Alignments

>gb|AF288483.3|Azospirillum brasilense Nifa (nifa) gene, complete cds
Length=2397

Score = 178 bits (96), Expect = 6e-42

Identities = 96/96 (100%), Gaps = 0/96 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 CGCAGCAACTGATATGCAAAAGGGCTTGCCCTTTCGACCGAGAGTTCCGAAACTTTCGAC 60
|||||

Sbjct 123 CGCAGCAACTGATATGCAAAAGGGCTTGCCCTTTCGACCGAGAGTTCCGAAACTTTCGAC 182

Query 61 AGTCCGCGCGCGAACGACTTGTACGGAAGCACGC 96
|||||

Sbjct 183 AGTCCGCGCGCGAACGACTTGTACGGAAGCACGC 218

```
>emb|HE577327.1| DAzospirillum brasilense sp245 main chromosome complete genome
Length=3023440

Features in this part of subject sequence:
protein of unknown function

Score = 172 bits (93), Expect = 3e-40
Identities = 95/96 (99%), Gaps = 0/96 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 CCGAGCAACTGATATGCAAAAGGGCTTGCCCTTCGACCGAGAGTTTCCGAAACTTTCGAC 60
|||||
|||||

Sbjct 1205929 CCGAGCAACTGATATGCAAAAGGGCTTGCCCTTCGACCGAGAGTTTCCGAAACTTTCGAC 1205870

Query 61 AGTCCGCAGCGCGAACGACTTGTACGGAAGCACGC 96
|||||
|||||

Sbjct 1205869 AGTCCGCAGCGCGAACGGCTTGTACGGAAGCACGC 1205834

>gb|AY677086.1| Azospirillum brasilense Nifa (nifa) gene, partial cds; and unknown genes
Length=3364

Score = 172 bits (93), Expect = 3e-40
Identities = 95/96 (99%), Gaps = 0/96 (0%)
```

```

Strand=Plus/Minus

Query 1   CGCAGCAACTGATATGCAAAAGGGCTTGCCTTTTCGACCGAGAGTTTCCGAAACTTTTCGAC 60
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 476 CGCAGCAACTGATATGCAAAAGGGCTTGCCTTTTCGACCGAGAGTTTCCGAAACTTTTCGAC 417

Query 61 AGTCCGCAGCGCGAACGACTTGTACGGAAGCACGC 96
          |||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct 416 AGTCCGCAGCGCGAACGGCTTGTACGGAAGCACGC 381

>emb|X60714.1| A.brasilense nifa gene
Length=2468

Score = 172 bits (93), Expect = 3e-40
Identities = 95/96 (99%), Gaps = 0/96 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1   CGCAGCAACTGATATGCAAAAGGGCTTGCCTTTTCGACCGAGAGTTTCCGAAACTTTTCGAC 60
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 192 CGCAGCAACTGATATGCAAAAGGGCTTGCCTTTTCGACCGAGAGTTTCCGAAACTTTTCGAC 251

```


Anexo III – .Curva de Melting e Curva de Amplificação da reação de titulação para a concentração de 600 nM dos iniciadores AznifA – F12 usando DNA de Azospirillum brasilense como DNA molde.

